

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2006 年 1 月 19 日 (19.01.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/006693 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 16/18 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中野 清孝 (NAKANO, Kiyotaka) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 吉野 武 (YOSHINO, Takeshi) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 根津 淳一 (NEZU, Jun-ichi) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 角田 浩行 (TSUNODA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒3004101 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 - 2 中外製薬株式会社内 Ibaraki (JP). 井川 智之 (IGAWA, Tomoyuki) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 小西 博子 (KONISHI, Hiroko) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 田中 めぐみ (TANAKA, Megumi) [JP/JP]; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 周郷 泉 (SUGO, Izumi) [JP/JP];

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/013103

(22) 国際出願日: 2005 年 7 月 8 日 (08.07.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

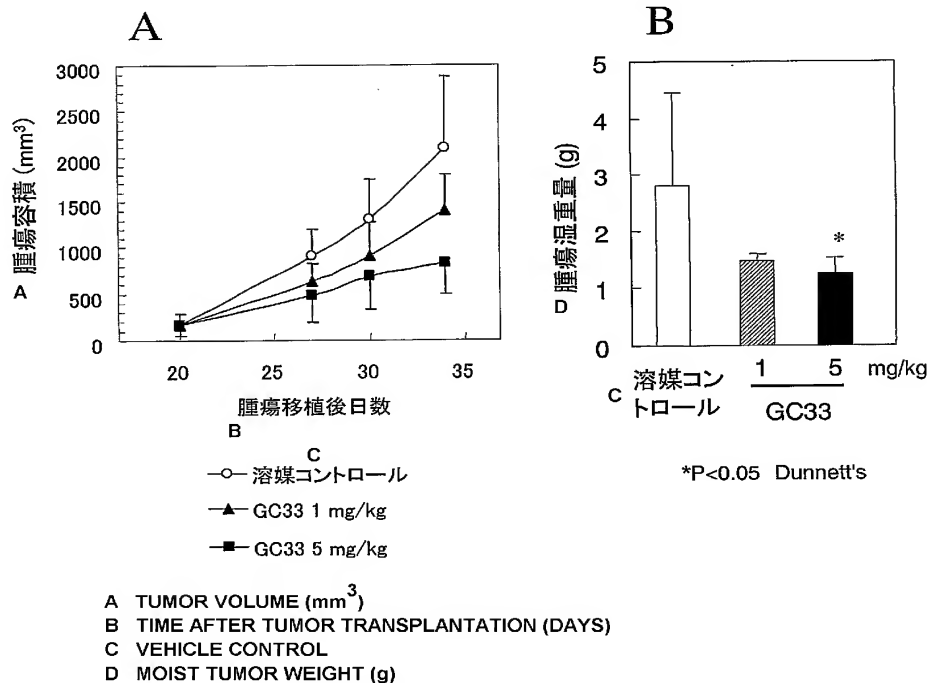
特願2004-203637 2004 年 7 月 9 日 (09.07.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間五丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: ANTI-GLYPICAN 3 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗グリピカン 3 抗体



(57) Abstract: It is intended to provide an antibody capable of binding to a specific region of glypican 3 and a humanized antibody constructed based on the above antibody. The anti-GPC3 antibody as described above, which has high ADCC and CDC activities compared with the existing antibodies, is useful as a cell proliferation inhibitor, an anticancer agent and a cancer diagnostic.

[続葉有]

WO 2006/006693 A1



〒4128513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 川合 重人 (KAWAI, Shigeto) [JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 石黒 敬弘 (ISHIGURO, Takahiro) [JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 木下 恭子 (KINOSHITA, Yasuko) [JP/JP]; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原200 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 大野 聖二, 外(OHNO, Seiji et al.); 〒1006036 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号 霞が関ビル36階 大野総合法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK,

LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約: グリピカン3の特定の領域に結合することができる抗体、ならびにこの抗体に基づいて作成されたヒト化抗体が提供される。本発明の抗GPC3抗体は、従来の抗体と比較して高いADCC活性およびCDC活性を有し、細胞増殖抑制剤として、抗癌剤として、および癌の診断薬として有用である。

明細書
抗グリピカン3抗体

技術分野

- 5 本発明は、抗グリピカン3抗体、ならびにかかる抗体を有効成分とする細胞増殖抑制剤および抗癌剤に関する。

背景技術

- 10 グリピカン3（GPC3）は、細胞表面上に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンのファミリーの1つであり、発生における細胞分裂や、癌細胞の増殖に関与している可能性があることが示唆されているが、その機能はまだよく解明されていない。

- 15 GPC3に結合するある種の抗体が、ADCC（抗体依存性細胞障害）活性およびCDC（補体依存性細胞障害）活性により細胞増殖抑制作用を有することが見いだされている（WO2003/000883）。また、GPC3が生体内で切断されて分泌型GPC3として血中に分泌され、これを検出する抗体を用いて癌の診断が可能であることが示唆されている（WO2004/022739、WO03/100429、WO2004018667）。

- 20 抗体の細胞傷害活性を利用した抗癌剤を開発する場合、用いられる抗体は高いADCC活性又はCDC活性を有していることが好ましい為、GPC3を認識する抗体として高い細胞傷害活性を有する抗GPC3抗体が望まれていた。

本発明は、従来の抗体と比較して高いADCC活性およびCDC活性を有する抗GPC3抗体を提供することを目的とする。

25 発明の開示

本発明者らは従来の抗グリピカン3抗体と比較して高い細胞傷害活性を有する抗体の取得に成功した。さらに、それらの抗体のエピトープを解析することにより、高い細胞傷害活性を発揮する抗体が認識するGPC3上の部位を見出すことに成功した。

本発明は、以下の（１）－（１２）のいずれか；

（１） 配列番号１２３に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１２４に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１２５に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

５ （２） 配列番号１０９に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１１０に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１１１に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

（３） 配列番号１０６に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１０７に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１０８に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

（４） 配列番号１３２に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１３３に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１３４に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

（５） 配列番号１０６に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１３５に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１３６に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

（６） 配列番号１２６に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１２７に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１２８に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

（７） 配列番号１２９に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１３０に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１３１に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

（８） 配列番号１０３に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１０４に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１０５に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

（９） 配列番号１１８に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号１２１に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号１２２に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

（１０） 配列番号１１５に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号

1 1 6 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 1 1 7 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(1 1) 配列番号 1 1 2 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1 1 3 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 1 1 4 に記載
5 されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ; または

(1 2) 配列番号 1 1 8 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1 1 9 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および 1 2 0 配列番号に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3

を有する重鎖可変領域を含む抗体を提供する。

10 別の観点においては、本発明は、以下の (1) - (1 3) のいずれか :

(1) 配列番号 1 4 3 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1 4 4 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 1 5 8 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(2) 配列番号 1 4 3 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1
15 4 4 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 1 4 5 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(3) 配列番号 1 4 0 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1 4 1 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 1 4 2 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

20 (4) 配列番号 1 6 7 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1 6 8 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 1 6 9 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(5) 配列番号 1 7 0 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1 4 4 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 1 7 1 に記載
25 されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(6) 配列番号 1 5 9 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1 6 0 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 1 6 1 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(7) 配列番号 1 6 2 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 1

47に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号163に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3；

(8) 配列番号164に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号165に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号166に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3；

(9) 配列番号137に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号138に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号139に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3；

(10) 配列番号155に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号156に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号157に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3；

(11) 配列番号149に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号150に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号151に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3；

(12) 配列番号146に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号147に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号148に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3；または

(13) 配列番号152に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号153に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号154に記載されるアミノ酸配列を含むCDR3

を有する軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。

好ましくは、本発明の抗体は、以下の(1) - (13)：

(1) それぞれ配列番号123、124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を有する重鎖可変領域、およびそれぞれ配列番号143、144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(2) それぞれ配列番号109、110および111に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を有する重鎖可変領域、およびそれぞれ配列番号143、144および145に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1、2およ

び3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(3) それぞれ配列番号106, 107および108に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号140, 141および142に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

5 び3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(4) それぞれ配列番号132, 133および134に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号167, 168および169に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

10 (5) それぞれ配列番号106, 135および136に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号170, 144および171に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(6) それぞれ配列番号126, 127および128に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号159, 160および161に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(7) それぞれ配列番号129, 130および131に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号162, 147および163に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(8) それぞれ配列番号129, 130および131に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号164, 165および166に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(9) それぞれ配列番号103, 104および105に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号137, 138および139に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(10) それぞれ配列番号118, 121および122に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号155, 156および157に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

- 5 (11) それぞれ配列番号115, 116および117に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号149, 150および151に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域, を含む抗体;

- 10 (12) それぞれ配列番号112, 113および114に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号146, 147および148に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体; および

- 15 (13) それぞれ配列番号118, 119および120に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号152, 153および154に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体
からなる群より選択される。

さらに別の観点においては、本発明は、以下の(1)～(7)のいずれかに記載の重鎖可変領域:

- 20 (1) 配列番号84に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
(2) 配列番号85に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
(3) 配列番号86に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
(4) 配列番号87に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
(5) 配列番号88に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
25 (6) 配列番号89に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;または
(7) 配列番号90に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
を有する抗体を提供する。

また別の観点においては、本発明は、配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体を提供する。

好ましくは、本発明の抗体は、以下の（１）～（７）の抗体：

- （１） 配列番号 ８４ に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 ９２ に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体；
 - （２） 配列番号 ８５ に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 ５ ９２ に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体；
 - （３） 配列番号 ８６ に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 ９２ に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体；
 - （４） 配列番号 ８７ に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 ９２ に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体；
 - 10 （５） 配列番号 ８８ に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 ９２ に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体；
 - （６） 配列番号 ８９ に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 ９２ に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体；および
 - （７） 配列番号 ９０ に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 15 ９２ に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体；
- からなる群より選択される。

さらに別の観点においては、本発明は以下の（１）－（１５）のいずれか：

- （１） 配列番号 １７４ に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号 １ 44 に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号 １５８ に記載さ 20 れるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；
- （２） 配列番号 １７５ に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号 １ 44 に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号 １５８ に記載さ れるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；
- （３） 配列番号 １７６ に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号 1 44 に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号 １５８ に記載さ 25 れるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；
- （４） 配列番号 １７７ に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ１，配列番号 １ 44 に記載されるアミノ酸配列を含むＣＤＲ２，および配列番号 １５８ に記載さ れるアミノ酸配列を含むＣＤＲ３；

(5) 配列番号 178 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

5 (6) 配列番号 179 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(7) 配列番号 180 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

10 (8) 配列番号 181 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(9) 配列番号 182 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(10) 配列番号 183 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

20 (11) 配列番号 184 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(12) 配列番号 185 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

25 (13) 配列番号 186 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(14) 配列番号 187 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載

されるアミノ酸配列を含むCDR 3；または

(15) 配列番号188に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

5 を有する軽鎖可変領域を含む抗体を提供する。

さらに別の観点においては、本発明は以下の(1) - (15)：

(1) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号174，144および158，に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(2) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号175，144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

15 (3) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号176，144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(4) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号177，144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(5) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号178，144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

25 (6) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号179，144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

び3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(7) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号180, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2およ

5 び3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(8) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号181, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

10 (9) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号182, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(10) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号183, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(11) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号184, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(12) それぞれ配列番号123, 124, および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号185, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域, を含む抗体；

(13) それぞれ配列番号123, 124, および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号186, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(14) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号187, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体; および

- 5 (15) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号188, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体,
からなる群より選択される抗体を提供する。

- 10 さらに別の観点においては、本発明は以下の(1)～(15):

- (1) 配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (2) 配列番号192に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (3) 配列番号193に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (4) 配列番号194に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - 15 (5) 配列番号195に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (6) 配列番号196に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (7) 配列番号197に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (8) 配列番号198に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (9) 配列番号199に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - 20 (10) 配列番号200に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (11) 配列番号201に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (12) 配列番号202に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (13) 配列番号203に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
 - (14) 配列番号204に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域; および
 - 25 (15) 配列番号205に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
- からなる群より選択される軽鎖可変領域を有する抗体を提供する。

さらに別の観点においては、本発明は、以下の(1)～(15)からなる群より選択される軽鎖可変領域:

- (1) 配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;

- (2) 配列番号 1 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (3) 配列番号 1 9 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (4) 配列番号 1 9 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (5) 配列番号 1 9 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - 5 (6) 配列番号 1 9 6 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (7) 配列番号 1 9 7 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (8) 配列番号 1 9 8 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (9) 配列番号 1 9 9 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (10) 配列番号 2 0 0 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - 10 (11) 配列番号 2 0 1 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (12) 配列番号 2 0 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (13) 配列番号 2 0 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (14) 配列番号 2 0 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および
 - (15) 配列番号 2 0 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - 15 および、以下の (1) ～ (7) からなる群より選択される重鎖可変領域：
 - (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 - (2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 - (3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 - (4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 - 20 (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 - (6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および
 - (7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- を有する抗体を提供する。

本発明の好ましい抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、ならびにこれらの

25 C D R 1, 2 および 3 のアミノ酸配列と、配列番号との対応を以下の一覧表に示す。

抗体およびその可変領域		配列番号
M3C11	H	22
M13B3	H	23
M1E7	H	24
M3B8	H	25
M11F1	H	26
M19B11	H	27
M6B1	H	28
M18D4	H	29
M5B9	H	30
M10D2	H	31
L9G11	H	32
M3C11	L	44
M13B3	L	45
M1E7	L	46
M3B8	L	47
M11F1	L	48
M19B11	L	49
M6B1	L	50
M18D4	L	51
M5B9	L	52
M10D2	L	53
L9G11	L	54
GC199	H	60
GC202	H	61
GC33	H	62
GC179	H	63
GC194	H	64
GC199	L	71
GC202	L	72
GC33	L	73
GC179	L	74
GC194(1)	L	75
GC194(2)	L	76
GC33.ver.a	H	84
GC33.ver.c	H	85
GC33.ver.f	H	86
GC33.ver.h	H	87
GC33.ver.i	H	88
GC33.ver.j	H	89
GC33.ver.k	H	90
GC33.ver.a	L	92
M13B3(H)	CDR1	103
	CDR2	104
	CDR3	105

M3B8(H)	CDR1	106
	CDR2	107
	CDR3	108
M11F1(H)	CDR1	109
	CDR2	110
	CDR3	111
M5B9(H)	CDR1	112
	CDR2	113
	CDR3	114
M6B1(H)	CDR1	115
	CDR2	116
	CDR3	117
M10D2(H)	CDR1	118
	CDR2	119
	CDR3	120
L9G11(H)	CDR1	118
	CDR2	121
	CDR3	122
GC33(H)	CDR1	123
	CDR2	124
	CDR3	125
GC179(H)	CDR1	126
	CDR2	127
	CDR3	128
GC194(H)	CDR1	129
	CDR2	130
	CDR3	131
GC199(H)	CDR1	132
	CDR2	133
	CDR3	134
GC202(H)	CDR1	106
	CDR2	135
	CDR3	136
M13B3(L)	CDR1	137
	CDR2	138
	CDR3	139
M3B8(L)	CDR1	140
	CDR2	141
	CDR3	142
M11F1(L)	CDR1	143
	CDR2	144
	CDR3	145
M5B9(L)	CDR1	146
	CDR2	147
	CDR3	148

M6B1(L)	CDR1	149
	CDR2	150
	CDR3	151
M10D2(L)	CDR1	152
	CDR2	153
	CDR3	154
L9G11(L)	CDR1	155
	CDR2	156
	CDR3	157
GC33(L)	CDR1	143
	CDR2	144
	CDR3	158
GC179(L)	CDR1	159
	CDR2	160
	CDR3	161
GC194(L)1	CDR1	162
	CDR2	147
	CDR3	163
GC194(L)2	CDR1	164
	CDR2	165
	CDR3	166
GC199(L)	CDR1	167
	CDR2	168
	CDR3	169
GC202(L)	CDR1	170
	CDR2	144
	CDR3	171
GC33(L)	G34A	174
GC33(L)	G34D	175
GC33(L)	G34E	176
GC33(L)	G34F	177
GC33(L)	G34H	178
GC33(L)	G34N	179
GC33(L)	G34P	180
GC33(L)	G34Q	181
GC33(L)	G34I	182
GC33(L)	G34K	183
GC33(L)	G34L	184
GC33(L)	G34V	185
GC33(L)	G34W	186
GC33(L)	G34Y	187
GC33(L)	G34R	188

また、上述のいずれかに記載の抗体のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつその抗体と同等の活性を有する抗体も本発明の範囲内である。好ましくは、本発明の抗体はヒト化抗体である。すなわち、別の観点においては、本発明はグリピカン3に結合するヒト化抗体を提供する。

さらに別の観点においては、本発明は、グリピカン3のアミノ酸残基524～563の配列を有するペプチドに結合する抗体を提供する。好ましくは、本発明の抗体は、グリピカン3のアミノ酸残基537～563の配列を有するペプチドに結合する。また好ましくは、本発明の抗体は、グリピカン3のアミノ酸残基550～563の配列からなるペプチドに結合しないことを特徴とする。好ましくは、本発明の抗体は、グリピカン3のアミノ酸残基544～553の配列を有するペプチドに結合し、また好ましくは、グリピカン3のアミノ酸残基546～551の配列を有するペプチドに結合する。

また別の観点においては、本発明は、それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域、およびそれぞれ配列番号143, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体が結合するエピトープに結合することができる抗体、すなわち、抗原との結合において競合する抗体を提供する。

さらに別の観点においては、本発明は、グリピカン3に結合し、かつグリピカン3を発現する細胞に対して高いCDC活性を有する抗体、ならびに、グリピカン3に結合し、かつグリピカン3を発現する細胞に対して高いADCC活性を有する抗体を提供する。

さらに別の観点においては、本発明は、上述の本発明のいずれかの抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号11-21、33-43、55-59、65-70、77-83のいずれかに記載の塩基配列を有する。

別の観点においては、本発明は、上述の本発明の抗体を有効成分とする細胞増殖抑制剤および抗癌剤を提供する。好ましくは、本発明の抗癌剤は、肝細胞癌を

治療するために用いられる。

さらに別の観点においては、グリピカン3のアミノ酸残基524～563のアミノ酸配列からなるペプチド、グリピカン3のアミノ酸残基537～563のアミノ酸配列からなるペプチド、グリピカン3のアミノ酸残基544～553のアミノ酸配列からなるペプチド、又はグリピカン3のアミノ酸残基546～551のアミノ酸配列からなるペプチドを提供する。

図面の簡単な説明

図1は、CHO細胞、全長GPC3発現CHO細胞、HepG2、HuH-7に対する抗GPC3抗体の結合活性をフローサイトメトリーにより評価した図である。M1E7（実線）、M11F1（破線）はそれぞれ5 μ g/mL濃度で使用した。

図2は、競合ELISAによるエピトープ分類の結果を示した表である。ビオチン化した抗GPC3抗体の結合に対する競合的な阻害の程度を%表示し、競合的阻害のパターンに従いaからeまでの5つのグループに分類された。

図3は、抗GPC3抗体が可溶性GPC3コアタンパク質の40kDaのN端断片に結合するか、30kDaのC端断片に結合するかウエスタンブロッティングにより評価した結果である。L9G11はN端断片に結合し、M3C11はC端断片に結合する事が判明した。

図4は、HepG2の培養上清中に分泌型GPC3が存在する事をサンドイッチELISAにより検出した結果である。M6B1、M18D4、M19B11等のN端断片に結合する抗体の組み合わせで高度に検出され、M3C11、M13B3、M3B8等のC端断片に結合する抗体では強くは検出されなかった。

図5は、抗GPC3抗体を用いてHepG2の培養上清の免疫沈降を行い、分泌型GPC3を検出した結果である。コントロールとして培地（レーン1、3）若しくはHepG2の培養上清（レーン2、4）をM1E7（レーン1、2）、M10D2（レーン3、4）を用いて免疫沈降を行った。N端断片に結合するM10D2により分泌型GPC3が検出された。

図6は、GPC3C末端ペプチドとGSTの融合タンパク質を利用して、GPC3C末端断片に結合する抗体のエピトープをウエスタンブロッティングにより分析し

た結果である。可溶型 GPC3 コアタンパク質（レーン1）、GST（レーン2）、GC-1（レーン3）、GC-2（レーン4）、GC-3（レーン5）、GC-4（レーン6）、GC-5（レーン7）を還元条件下にて SDS 電気泳動後、M3C11、M11F1 を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。

- 5 図7は、抗 GPC3 マウスーヒトキメラ抗体の、GPC3 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性を評価した結果である。

図8は、抗 GPC3 マウスーヒトキメラ抗体の、GPC3 発現 CHO 細胞、および HepG2 に対する ADCC 活性を評価した結果である。

- 10 図9は、マウス骨髄由来エフェクター細胞を用いて、GC33 のヒト肝癌細胞株 HuH-7 に対する ADCC 活性を評価した結果である。

図10は、GC33 抗体のヒト肝癌移植マウスモデルに対する抗腫瘍活性を評価した結果である。

図11は、GC33 のマウスーヒトキメラ抗体の、GPC3 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性を評価した結果である。

- 15 図12は、GC33 のマウスーヒトキメラ抗体の、HepG2 に対する ADCC 活性を評価した結果である。

図13は、GC33 のエピトープ解析用に作製した GST 融合タンパク質（GC-4、5、6、7、8、9、11、12、13、14）に含まれる GPC3 由来配列を示した図である。

- 20 図14は、GST、GC-7、8、9、11、12、13、14 を還元条件下にて SDS-PAGE により分離後、GC33 を用いてウエスタンブロッティングを行った結果である。

図15は、ヒト化 GC33 の GPC3 に対する結合活性を ELISA により評価した結果である。

- 25 図16は、可溶型 GPC3 免疫マウス由来クローンについて、アイソタイプ、ELISA、BIAcore、FACS、エピトープ解析、免疫沈降実験の結果をまとめた抗体パネルである。

図17は、GC-3 免疫マウス由来クローンについて、アイソタイプ、ELISA、FACS、エピトープ解析の結果をまとめた抗体パネルである。

図18は、ヒト化 GC33L 鎖可変領域 CDR1 に位置する Gly34 を Cys、Met を除く他の17アミノ酸に置換した改変型抗体の、可溶型 GPC3 コア蛋白質に対する結合活性を ELISA により評価した結果である。

図19は、GC33、M3C11、および M1E7 マウスーヒトキメラ抗体の、全長
5 GPC3 発現 CHO 細胞に対する CDC 活性を評価した結果である。

図20は、GC33、M3C11、および M1E7 マウスーヒトキメラ抗体の、全長 GPC3 発現ヒト肝癌細胞株 SK-03 に対する ADCC 活性を評価した結果である。

発明の詳細な説明

10 抗体

本発明は、下記の(I)～(XI)に記載の抗体を提供する。

(I) 以下の(1)～(12)のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなるCDR 1、2、3を有する重鎖可変領域を含む抗体：

- (1) 配列番号123、124、125 (GC33)
- 15 (2) 配列番号109、110、111 (M11F1)
- (3) 配列番号106、107、108 (M3B8)
- (4) 配列番号132、133、134 (GC199)
- (5) 配列番号106、135、136 (GC202)
- (6) 配列番号126、127、128 (GC179)
- 20 (7) 配列番号129、130、131 (GC194)
- (8) 配列番号103、104、105 (M13B3)
- (9) 配列番号118、121、122 (L9G11)
- (10) 配列番号115、116、117 (M6B1)
- (11) 配列番号112、113、114 (M5B9)
- 25 (12) 配列番号118、119、120 (M10D2)。

上記(1)～(12)の抗体の中で好ましいものは(1)～(8)の抗体であり、さらに好ましいものは(1)～(5)の抗体であり、特に好ましい抗体は(1)の抗体である。上記(1)～(8)の抗体はグリピカン3のC末端側ペプチド（グリピカン3の374番目のアミノ酸から580番目のアミノ酸までのペプチド）を認識し、治療用抗体とし

て有用である。また、上記(9)～(12)の抗体はグリピカン3のN末端側ペプチド（グリピカン3の1番目のアミノ酸から373番目のアミノ酸までのペプチド）を認識し、診断用抗体として有用である。

(II) 以下の(1)～(13)のいずれかの配列番号に記載のアミノ酸配列からなるCDR

- 5 1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体：
- (1) 配列番号143、144、158 (GC33)
 - (2) 配列番号143、144、145 (M11F1)
 - (3) 配列番号140、141、142 (M3B8)
 - (4) 配列番号167、168、169 (GC199)
 - 10 (5) 配列番号170、144、171 (GC202)
 - (6) 配列番号159、160、161 (GC179)
 - (7) 配列番号162、147、163 (GC194 (1))
 - (8) 配列番号164、165、166 (GC194 (2))
 - (9) 配列番号137、138、139 (M13B3)
 - 15 (10) 配列番号155、156、157 (L9G11)
 - (11) 配列番号149、150、151 (M6B1)
 - (12) 配列番号146、147、148 (M5B9)
 - (13) 配列番号152、153、154 (M10D2)。

上記(1)～(13)の抗体の中で好ましいものは(1)～(8)の抗体であり、さらに好ましいものは(1)～(5)の抗体であり、特に好ましい抗体は(1)の抗体である。上記(1)～(8)の抗体はグリピカン3のC末端側ペプチド（グリピカン3の374番目のアミノ酸から580番目のアミノ酸までのペプチド）を認識し、治療用抗体として有用である。また、上記(9)～(13)の抗体はグリピカン3のN末端側ペプチド（グリピカン3の1番目のアミノ酸から373番目のアミノ酸までのペプチド）を認識し、診断用抗体として有用である。

(III) 以下の(1)～(13)の抗体：

- (1) 配列番号123、124、125に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3を有する重鎖可変領域、および配列番号143、144、158に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC33)

- (2) 配列番号 109、110、111 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 143、144、145 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M11F1)
- 5 (3) 配列番号 106、107、108 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 140、141、142 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M3B8)
- (4) 配列番号 132、133、134 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 167、168、169 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC199)
- 10 (5) 配列番号 106、135、136 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 170、144、171 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC202)
- 15 (6) 配列番号 126、127、128 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 159、160、161 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC179)
- 20 (7) 配列番号 129、130、131 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 162、147、163 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC194(1))
- (8) 配列番号 129、130、131 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 164、165、166 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC194(2))
- 25 (9) 配列番号 103、104、105 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 137、138、139 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (GC194(3))

ノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 1 3 B 3)

(10) 配列番号 1 1 8、1 2 1、1 2 2 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 5 5、1 5 6、1 5 7 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (L 9 G 1 1)

(11) 配列番号 1 1 5、1 1 6、1 1 7 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 9、1 5 0、1 5 1 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 6 B 1)

10 (12) 配列番号 1 1 2、1 1 3、1 1 4 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 4 6、1 4 7、1 4 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 5 B 9)

(13) 配列番号 1 1 8、1 1 9、1 2 0 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 5 2、1 5 3、1 5 4 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体 (M 1 0 D 2) からなる群より選択される抗体。

上記(1)～(13)の抗体の中で好ましいものは(1)～(8)の抗体であり、さらに好ましいものは(1)～(5)の抗体であり、特に好ましい抗体は(1)の抗体である。上記(1)～(8)の抗体はグリピカン 3 の C 末端側ペプチド (グリピカン 3 の 3 7 4 番目のアミノ酸から 5 8 0 番目のアミノ酸までのペプチド) を認識し、治療用抗体として有用である。また、上記(9)～(13)の抗体はグリピカン 3 の N 末端側ペプチド (グリピカン 3 の 1 番目のアミノ酸から 3 7 3 番目のアミノ酸までのペプチド) を認識し、診断用抗体として有用である。

(IV) 以下の(1)～(7)のいずれかに記載の重鎖可変領域：

25 (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.a) ；

(2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.c) ；

(3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH

ver.f) ;

(4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.h) ;

5 (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.i) ;

(6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.j) ;

(7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.k) ;

10 を有する抗体。

上記(1)~(7)の抗体の中で特に好ましい抗体は(2)~(7)の抗体である。

(V) 配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体。

(VI) 以下の(1)~(7)の抗体 :

15 (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.a) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体 ;

(2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.c) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体 ;

20 (3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.f) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体 ;

(4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.h) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体 ;

25 (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.i) および配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を有する抗体 ;

(6) 配列番号 89 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.j) および配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体;

(7) 配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (GC33 VH ver.k)

5 および配列番号 92 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (GC33 VL ver.a) を含む抗体;

からなる群より選択される抗体。

上記(1)~(7)の抗体の中で特に好ましい抗体は(2)~(7)の抗体である。

(VII) 以下の(1)~(15)のいずれかの抗体:

10 (1) 配列番号 174、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(2) 配列番号 175、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

15 (3) 配列番号 176、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(4) 配列番号 177、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(5) 配列番号 178、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

20 (6) 配列番号 179、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(7) 配列番号 180、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

25 (8) 配列番号 181、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(9) 配列番号 182、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(10) 配列番号 183、144、158 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

- (11) 配列番号 1 8 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (12) 配列番号 1 8 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- 5 (13) 配列番号 1 8 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (14) 配列番号 1 8 7、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (15) 配列番号 1 8 8、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR 1、
10 2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

上記(1)～(15)の抗体の中で好ましい抗体は(15)の抗体である。

(VIII) 以下の(1)～(15)いずれかの抗体：

- (1) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミ
15 ノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (2) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (3) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、
20 3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (4) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 7、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- 25 (5) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 8、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；
- (6) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 7 9、1 4 4、1 5 8 に記載のアミ

ノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(7) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 0、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

5 (8) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 1、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(9) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 2、1 4 4、1 5 8 に記載のアミ

10 ノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(10) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 3、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(11) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、
15 3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 4、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(12) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 5、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

20 (13) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 6、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(14) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 7、1 4 4、1 5 8 に記載のアミ

25 ノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(15) 配列番号 1 2 3、1 2 4、1 2 5 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する重鎖可変領域、および配列番号 1 8 8、1 4 4、1 5 8 に記載のアミノ酸配列からなる CDR1、2、3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

上記(1)～(15)の抗体の中で好ましい抗体は(15)の抗体である。

(IX) 以下の(1)～(15)のいずれかに記載の抗体：

- (1)配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (2)配列番号192に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (3)配列番号193に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- 5 (4)配列番号194に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (5)配列番号195に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (6)配列番号196に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (7)配列番号197に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (8)配列番号198に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- 10 (9)配列番号199に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (10)配列番号200に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (11)配列番号201に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (12)配列番号202に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (13)配列番号203に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- 15 (14)配列番号204に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体；
- (15)配列番号205に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体。

上記(1)～(15)の抗体の中で好ましい抗体は(15)の抗体である。

(X) 以下の(1)～(15)からなる群より選択される軽鎖可変領域：

- (1)配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- 20 (2)配列番号192に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (3)配列番号193に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (4)配列番号194に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (5)配列番号195に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (6)配列番号196に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- 25 (7)配列番号197に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (8)配列番号198に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (9)配列番号199に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (10)配列番号200に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (11)配列番号201に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

(12)配列番号 2 0 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

(13)配列番号 2 0 3 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

(14)配列番号 2 0 4 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

(15)配列番号 2 0 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

5 および、以下の(1)～(7)からなる群より選択される重鎖可変領域：

(1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

10 (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

を有する抗体。

上記の抗体の中で好ましい抗体は、配列番号 2 0 5 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域および配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を有する抗体である。

(XI) 上記の(I)～(X)のいずれかに記載のアミノ酸配列において 1 または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入され、かつ(I)～(X)のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体。

20 本発明において、(I)～(X)のいずれかに記載の抗体と同等の活性とは、ヒトグリピカン 3 抗体への結合活性、またはヒトグリピカン 3 を発現する細胞（例えば、HepG2 またはヒトグリピカン 3 発現組換え CHO 細胞、など）への細胞傷害活性が同等であることをいう。

25 ヒト化抗体

本発明における抗体の好ましい態様の一つとして、グリピカン 3 に結合するヒト化抗体を挙げることができる。ヒト化抗体は既知の方法を用いて製造することができる。

ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外

の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR; complementarity determining region）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号 EP 125023 号公報、WO 96/02576 号公報参照）。

- 5 具体的には、例えば CDR がマウス抗体由来である場合には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域（framework region ; FR）とを連結するように設計した DNA 配列を、CDR および FR 両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて PCR 法により合成する(WO98/13388 号公報に記載の方法を参照)。
- 10 CDR と連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K.etal., CancerRes. (1993) 53, 851-856）。
- 15 キメラ抗体およびヒト化抗体の C 領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えば H 鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4 を、L 鎖では C κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体 C 領域を修飾してもよい。ヒト化の際に用いられるヒト抗体は、IgG、IgM、IgA、IgE、IgD など如何なるアイソタイプのヒト抗体でもよいが、本発明にお
- 20 いては IgG を用いることが好ましく、さらに IgG1 又は IgG3 が好ましく、特に IgG1 が好ましい。IgG1 は高い細胞傷害活性を有している点で抗体を抗癌剤として利用する場合に有効である（Chemical immunology, 65:88 (1997)）。

なお、ヒト化抗体を作製した後に、可変領域（例えば、FR）や定常領域中のアミノ酸を他のアミノ酸で置換等してもよい。

- 25 ヒト化抗体における CDR の由来は特に限定されず、どのような動物由来でもよい。例えば、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ラクダ抗体などの配列を用いることが可能であるが、好ましくはマウス抗体の CDR 配列である。

抗体のヒト化において、通常、由来となった抗体のアゴニスト活性を維持したままヒト化を行うことは困難であるが、本発明においては、由来となったマウス

抗体と同等のアゴニスト活性を有するヒト化抗体の取得に成功した。ヒト化抗体はヒト体内における抗原性が低下しているため、治療目的などでヒトに投与する場合に有用である。

- 本発明においてヒト化抗グリピカン3抗体の好ましい例としては、例えば、配列番号84 (GC33 VH ver.a)、配列番号85 (GC33 VH ver.c)、配列番号86 (GC33 VH ver.f)、配列番号87 (GC33 VH ver.h)、配列番号88 (GC33 VH ver.i)、配列番号89 (GC33 VH ver.j) または配列番号90 (GC33 VH ver.k) に記載の重鎖可変領域を有する抗体、または配列番号92 (GC33 VL ver.a) に記載の軽鎖可変領域を有する抗体を挙げることができる。
- 特に好ましい例としては、配列番号84 (GC33 VH ver.a)、配列番号85 (GC33 VH ver.c)、配列番号86 (GC33 VH ver.f)、配列番号87 (GC33 VH ver.h)、配列番号88 (GC33 VH ver.i)、配列番号89 (GC33 VH ver.j) または配列番号90 (GC33 VH ver.k) に記載の重鎖可変領域と、配列番号92 (GC33 VL ver.a) に記載の軽鎖可変領域とを有する抗体を挙げることができる。

さらに、本発明のヒト化抗グリピカン3抗体の好ましい例としては、配列番号90に記載の重鎖可変領域と配列番号205に記載の軽鎖可変領域とを有する抗体を挙げることができる。

- 本発明における抗体の好ましい態様の一つとして、以下の(1)~(8)のいずれかに記載の抗体：

- (1) 配列番号62に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号73に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 (GC33) ；
- (2) 配列番号26に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号48に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 (M11F1) ；
- (3) 配列番号25に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号47に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 (M3B8) ；
- (4) 配列番号60に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号71に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 (GC19

9) ;

(5) 配列番号 6 1 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 7 2 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (G C 2 0 2) ;

5 (6) 配列番号 6 3 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 7 4 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (G C 1 7 9) ;

(7) 配列番号 6 4 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 7 5 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (G C 1 9 4 (1)) ;

(8) 配列番号 6 4 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 7 6 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域 (G C 1 9 4 (2)) ;

10 が結合するエピトープに結合する抗体を挙げることができる。さらに好ましくは (1)~(5)のいずれかに記載の抗体が結合するエピトープに結合する抗体であり、特に好ましくは(1)に記載の抗体が結合するエピトープに結合する抗体である。

上記いずれかの抗体が結合するエピトープに結合する抗体は、特に高い細胞傷害活性を有する点で有用である。

15 上記(1)~(7)いずれかに記載の抗体はヒトグリピカン 3 の 5 2 4 番目のアミノ酸から 5 8 0 番目のアミノ酸までの領域に結合し、特に 5 2 4 番目のアミノ酸から 5 6 3 番目のアミノ酸までの領域に結合する。上記(1)~(5)いずれかに記載の抗体はヒトグリピカン 3 の 5 3 7 番目のアミノ酸から 5 6 3 番目の領域に結合する。上記(1)に記載の抗体は、5 4 4 番目のアミノ酸から 5 5 3 番目のアミノ酸
20 の領域に結合し、特に 5 4 6 番目のアミノ酸から 5 5 1 番目の領域に結合する。

上記エピトープを認識する抗体は、高い細胞傷害活性を有するので癌などの疾患の治療用として有用である。特に、5 4 6 番目のアミノ酸から 5 5 1 番目の領域に結合する抗体は特に細胞傷害活性が高いので有用である。

従って、本発明は、ヒトグリピカン 3 の 5 2 4 番目のアミノ酸から 5 8 0 番目のアミノ酸までの領域、好ましくは 5 2 4 番目のアミノ酸から 5 6 3 番目のアミノ酸までの領域、さらに好ましくは 5 3 7 番目のアミノ酸から 5 6 3 番目のアミノ酸までの領域、さらに好ましくは 5 4 4 番目のアミノ酸から 5 5 3 番目のアミノ酸までの領域、特に好ましくは 5 4 6 番目のアミノ酸から 5 5 1 番目のアミノ酸までの領域をエピトープとして、それらの領域に結合する抗体を含む。
25

本発明において好ましい他の態様としては、ヒトグリピカン3の524番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域を認識し、かつ、537番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域を認識しない抗体を挙げることができる。

- 5 さらに、本発明において好ましい他の態様としては、ヒトグリピカン3の537番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域を認識し、かつ、550番目のアミノ酸から563番目のアミノ酸までの領域を認識しない抗体を挙げることができる。

- 10 抗体が認識するエピトープの解析は当業者に公知の方法により行うことが可能であり、例えば実施例記載のウェスタンブロットティング法などにより行うことが可能である。

- 15 上記の領域をエピトープとして認識する抗体は、当業者に公知の方法により得ることが可能であり、例えば、ヒトグリピカン3のアミノ酸配列を基に目的の領域のアミノ酸配列を含むペプチドを作製し、該ペプチドを免疫原として抗体を作製することにより、または、通常の方法で抗体を作製した後、得られた抗体が認識するエピトープを決定し、目的のエピトープを認識する抗体を選択することにより得ることが可能である。

- 20 本発明の抗グリピカン3抗体の好ましい例としては、グリピカン3を発現する細胞に対して高いADCC活性を有する抗体または高いCDC活性を有する抗体を挙げることができる。

本発明において高いADCC活性または高いCDC活性とは、公知の抗グリピカン3抗体よりも高いADCC活性または高いCDC活性を有することをいう。公知のグリピカン3抗体としては、WO2004/22739に記載されているM3C11またはM1E07を挙げることができる。

- 25 ADCC活性またはCDC活性の測定方法は、当業者に公知の方法により行うことが可能であり、例えば、クロム遊離試験により行うことが可能である。ADCC活性を測定する際のクロム遊離試験の具体的な条件としては、特に限定されないが、例えば、実施例記載の条件を用いて測定することができる。

グリピカン3を発現する細胞としては、例えば、HepG2などの肝癌細胞、グ

リピカン 3 をコードする遺伝子を組み込まれた CHO 細胞などを挙げるができる。ADCC 活性を測定する場合には HepG2 細胞を用いることが好ましく、CDC 活性を測定する場合には GPC3 発現組換え CHO 細胞を用いることが好ましい。GPC3 発現組換え CHO 細胞は如何なる方法により作製されてもよいが、例えば実施例に記載の方法により作製することが可能である。

抗グリピカン 3 抗体を抗癌剤として用いる場合には、配列番号 62 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 73 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 (GC33) と同程度の ADCC 活性を有していることが好ましい。抗グリピカン 3 抗体を抗癌剤として用いる場合には、配列番号 62 に記載のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 73 に記載のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を有する抗体 (GC33) と同程度の CDC 活性を有していることが好ましい。

さらに本発明はグリピカン 3 への結合活性が高い抗体を含む。

本発明において、グリピカン 3 への結合活性は、当業者に公知の手段を使用して測定することができる。例えば、BLAcore を用いた表面プラズモン共鳴を利用して測定することが可能である。すなわちセンサーチップ上にグリピカン 3 タンパク質を固定して抗体と反応させ、測定値から抗体とグリピカン 3 の相互作用を反応速度定数として算出することができる。また、結合活性の評価には、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、被験抗体が結合する抗原をコーティングしたプレートに、被験抗体を含む試料、例えば、被験抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。結合活性の上限は特に限定されないが、例えば、当業者が技術的に作製可能な範囲の上限を設定することができる。しかしながら、技術的に作製可能な範囲は、技術の進歩により拡大されることが理解されるであろう。

さらに、本発明においては、抗体の安定性を増加させる等の目的で脱アミド化

されるアミノ酸若しくは脱アミド化されるアミノ酸に隣接するアミノ酸を他のアミノ酸に置換することにより脱アミド化を抑制してもよい。脱アミド化されるアミノ酸としてはアスパラギン、グルタミンを挙げることができるが、好ましくはアスパラギンである。アスパラギンに隣接するアミノ酸としては、特に限定されずどのようなアミノ酸でもよいが、アスパラギン-グリシン配列は特に脱アミド化されやすいことが知られているので、アスパラギンに隣接するアミノ酸としてはグリシンが好ましい。置換後のアミノ酸としては、アスパラギンおよびグルタミン以外であれば特に限定されず、如何なるアミノ酸でもよいが、好ましくはバリン、プロリン以外のアミノ酸であることが好ましい。従って、本発明においては、抗体の脱アミド化を目的とする場合には、アスパラギン、グルタミン、バリン、プロリン以外のアミノ酸に置換することが好ましい。アミノ酸置換による脱アミド化の抑制については、例えばWO 03/057881を参考に行うことが可能である。脱アミド化抑制を目的にアミノ酸置換を行う場合には、置換前の抗原結合活性を維持していることが好ましい。

さらに、抗体安定化の他の態様として、グルタミン酸の他のアミノ酸への置換を挙げることができる。また、本発明では、抗体重鎖の6番目がグルタミン酸である場合、該グルタミン酸をグルタミンに置換することにより、顕著に抗体を安定化できることを見いだした。したがって、本発明は、抗体重鎖の6番目のグルタミン酸をグルタミンに置換することにより抗体を安定化する方法に関する。抗体中のアミノ酸番号は当業者に公知である（例えば、Kabat, E. A. et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Dept. Health and Human Services 1983）。

本発明の抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）、放射性物質、トキシン等の各種分子と結合したコンジュゲート抗体でもよい。このようなコンジュゲート抗体は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野においてすでに確立されている。本発明における抗体にはこれらのコンジュゲート抗体も包含される。

又、本発明に使用する抗体は二種特異性抗体（bispecific antibody）でもよい（例えば、Journal of Immunology, 1994, 152, 5368-5374、など）。二種特異性

抗体は一方がグリピカン 3 を認識し、他方が他の抗原を認識してもよいし、グリピカン 3 分子上の異なるエピトープを認識してもよい。

また本発明の抗体は、その N 末端あるいは C 末端に他のタンパク質を融合してもよい (Clinical Cancer Research, 2004, 10, 1274-1281)。融合するタンパク質は当業者が適宜選択することができる。

さらに、本発明の抗体は細胞障害活性が増強された抗体でもよい。細胞障害活性が増強された抗体としては、例えば、フコースが欠損した抗体、糖鎖にバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が付加した抗体、Fc 領域のアミノ酸を置換することにより Fc γ 受容体との結合活性を変化させた抗体などを挙げることができる。これら細胞障害活性が増強された抗体は当業者に公知の方法で作製することができる。

抗体の作成方法

グリピカン 3 に結合する抗体は当業者に公知の方法により作成することができる。例えば、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、グリピカン 3 タンパク質またはグリピカン 3 発現細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって哺乳動物を免疫する。得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞を選択することができる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。まず、配列番号 3 および 4 に示されるグリピカン 3 遺伝子 / アミノ酸配列にしたがってグリピカン 3 タンパク質を取得し、これを抗体取得の感作抗原として使用する。すなわち、グリピカン 3 をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のヒトグリピカン 3 タンパク質を公知の方法で精製する。

次に、この精製グリピカン 3 タンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、グリピカン 3 の部分ペプチドを感作抗原として使用することもできる。この際、部分ペプチドはヒトグリピカン 3 のアミノ酸配列にしたがって化学合成により得

ることも可能である。

本発明の抗グリピカン3抗体の認識するグリピカン3分子上のエピトープは特定のものに限定されず、グリピカン3分子上に存在するエピトープならばどのエピトープを認識してもよい。従って、本発明の抗グリピカン3抗体を作製するための抗原は、グリピカン3分子上に存在するエピトープを含む断片ならば、如何なる断片も用いることが可能である。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原を PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に 4-21 日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように哺乳動物を免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合すべき親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (deSt. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法（Kohler, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46）等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を 1-10 倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適な RPMI1640 培養液、MEM 培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め 37℃程度に加温した PEG 溶液（例えば平均分子量 1000-6000 程度）を通常 30-60%（w/v）の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞（ハイブリドーマ）を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

このようにして得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。上記 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、数日～数週間）継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫してハイブリドーマを得る方法の他に、ヒトリンパ球を *in vitro* でグリピカン 3 に感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久的分裂能を有するミエローマ細胞と融合させ、グリピカン 3 への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平 1-59878 号公報参照）。さらに別

の方法では、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるグリピカン 3 を投与して抗グリピカン 3 抗体産生細胞を取得し、これを不死化させ、その細胞からグリピカン 3 に対するヒト抗体を取得することができる（国際特許出願公開番号 WO 94/25585 号公報、WO 93/12227 号公報、
5 WO92/03918 号公報、WO 94/02602 号公報参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリド
10 マーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型の抗体
15 を作製することも可能である（例えば、Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990 参照）。

具体的には、抗グリピカン 3 抗体を産生するハイブリドーマから、抗グリピカン 3 抗体の可変 (V) 領域をコードする mRNA を単離する。mRNA の単離は、
20 公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により行って全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) 等を使用して目的の mRNA を調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いるこ
25 とにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて抗体 V 領域の cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社製) 等を用いて行う。また、cDNA の合成および増幅を行うには、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 製) および PCR を用いた 5'-

RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) 等を使用することができる。

5 得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を精製し、ベクターDNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とする DNA の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認する。

10 目的とする抗グリピカン 3 抗体の V 領域をコードする DNA を得たのち、これを、所望の抗体定常領域 (C 領域) をコードする DNA を含有する発現ベクターへ組み込む。

本発明で使用される抗グリピカン 3 抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、
15 抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、H 鎖または L 鎖をコードするポリヌクレオチドを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードするポリヌクレオチドを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい (WO 94/11523 号公報参照)。

20

ポリヌクレオチド

別の観点においては、本発明は、本発明の抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを提供する。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、配列番号 11-21、33-43、55-59、65-70、77-83 のいずれかに記載の塩基配列を有する。また、該ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードするポリヌクレオチドも本発明の範囲内である。
25

本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードする限り、特に限定されず、複数のデオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) 等のヌクレオチ

ドからなる重合体である。天然以外の塩基を含んでいてよい。本発明のポリヌクレオチドは、抗体を遺伝子工学的な手法により製造するために使用することができる。また本発明の抗体と同等な機能を有する抗体をスクリーニングするために、プローブとして用いることもできる。即ち本発明の抗体をコードするポリヌクレオチド、またはその一部をプローブとして用い、ハイブリダイゼーション、遺伝子増幅技術（例えば PCR）等の技術により、該ポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ本発明の抗体と同等の活性を有する抗体をコードする DNA を得ることができる。このような DNA も本発明のポリヌクレオチドに含まれる。

- 5 ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）は当業者によく知られた技術である。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば 42℃、0.1×SSC、0.1%SDS の条件であり、好ましくは 50℃、0.1×SSC、0.1%SDS の条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば 65℃、5×SSC および 0.1%SDS の条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するポリヌクレオチドが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。
- 10
- 15
- 20

- 25 これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により得られるポリヌクレオチドがコードする、本発明の抗体と機能的に同等な抗体は、通常、これら抗体とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明の抗体には、本発明の抗体と機能的に同等であり、かつ該抗体のアミノ酸配列と高い相同性を有する抗体も含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも 50%以上の同一性、好ましくは 75%以上の同一性、さらに好ましくは 85%以上の同一性、さらに好ましくは 95%以上の同一性を指す。ポリペプチドの相同性

を決定するには、文献 (Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730) に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。このようなベクターは、本発明の抗体を製造するために用いることができる。本発明の
5 ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌 (例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue) など大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子 (例えば、なんらかの薬剤 (アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール) により判別できるような薬剤耐性
10 遺伝子) を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script などが挙げられる。また、cDNA のサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7 などが挙げられる。

本発明のベクターとしては、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクター
15 としては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主を JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue などの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZ プロモーター (Ward ら, Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) 、araB プロモーター (Better ら,
20 Science (1988) 240, 1041-1043) 、または T7 プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX-5X-1 (ファルマシア社製)、「QIAexpress system」(キアゲン社製)、pEGFP、または pET(この場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい)などが挙げられる。

25 また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明のベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（インビトロゲン社製）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（ギブコ BRL 社製）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば pMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（インビトロゲン社製）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば SV40 プロモーター（Mulligan ら, Nature (1979) 277, 108）、MMTV-LTR プロモーター、EF1 α プロモーター（Mizushima ら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）、CMV プロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418 など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DHFR 遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOI など）を導入し、メトトレキサート（MTX）により増幅させることができる。また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて SV40 の複製起点を持つベクター（pcD など）で形質転換することができる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス（BPV）等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ

(TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明の抗体を製造するためには、該ベクターを宿主細胞に導入する。ベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。宿主細胞は、例えば、本発明の抗体の製造や発現のための産生系として使用することができる。ポリペプチド製造のための産生系は、*in vitro* および *in vivo* の産生系がある。*in vitro* の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

- 10 真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5 が挙げられる。本発明においては、CHO-DG44、CHO-DXB11、COS7 細胞、BHK 細胞が好適に用いられる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリボソーム DOTAP (ベーリンガーマンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

- 20 植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、サッカロミセス・ポンベ (Saccharomyces pombe) 糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) が挙げられる。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系を使用することができる。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101 等、

および枯草菌が挙げられる。

組換え抗体の製造

本発明の抗体は、上記宿主細胞を培養することにより製造することができる。

- 5 目的とするポリヌクレオチドにより形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより、抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができる。その際、FBS、牛胎児血清（FCS）等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は、約 6～8 であるのが好ましい。培養は、通常、約 30～40℃で約 15～200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。
- 10

- 一方、*in vivo* でポリペプチドを産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物または植物に目的とするポリヌクレオチドを導入し、動物または植物の体内でポリペプチドを産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。
- 15

- 動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993）。また、哺乳類動物としてトランスジェニック動物を用いることができる。
- 20

- 例えば、目的とするポリヌクレオチドを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるポリペプチドをコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から、目的の抗体を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生される抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。
- 25

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場

合、目的の抗体をコードするポリヌクレオチドを挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の抗体を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

- さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする抗体をコードするポリヌクレオチドを植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

- 以上のようにして得られた抗体は、宿主細胞内または細胞外 (培地など) から単離し、実質的に純粋で均一な抗体として精製することができる。抗体の分離、精製は、通常のポリペプチドの精製で使われている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればポリペプチドを分離、精製することができる。

- クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。例えば、プロテイン A を用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

なお、抗体の精製前または精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タ

ンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

診断方法

- 5 別の観点においては、本発明は、本発明の抗体を用いて被検試料中の GPC3 タンパク質を検出し、癌などの疾患の診断を行う方法を提供する。

検出とは、定量的または非定量的な検出を含み、例えば、非定量的な検出としては、単に GPC3 タンパク質が存在するか否かの測定、GPC3 タンパク質が一定の量以上存在するか否かの測定、GPC3 タンパク質の量を他の試料（例えば、
10 コントロール試料など）と比較する測定などを挙げることができ、定量的な検出としては、GPC3 タンパク質の濃度の測定、GPC3 タンパク質の量の測定などを挙げることができる。

被検試料とは、GPC3 タンパク質が含まれる可能性のある試料であれば特に制限されないが、哺乳類などの生物の体から採取された試料が好ましく、さらに好ましくはヒトから採取された試料である。被検試料の具体的な例としては、例えば、
15 血液、間質液、血漿、血管外液、脳脊髄液、滑液、胸膜液、血清、リンパ液、唾液、などを挙げることができるが、好ましいものは血液、血清、血漿である。また、生物の体から採取された細胞の培養液などの、被検試料から得られる試料も本発明の被検試料に含まれる。

- 20 診断される癌は、特に制限されず、具体的には、肝癌、膵臓癌、肺癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌、白血病、リンパ腫などを挙げることができるが、好ましいものは肝癌である。検出する GPC3 は、特に限定されず、全長 GPC3 でも、その断片でもよい。GPC3 断片を検出する場合には、N端断片でもC端断片でもよいが、好ましくはN端断片である。また、ヘパラン硫酸などが付加された GPC3 タン
25 パク質でも、GPC3 コアタンパク質でもよい。

被検試料に含まれる GPC3 タンパク質の検出方法は特に限定されないが、抗 GPC3 抗体を用いた免疫学的方法により検出することが好ましい。免疫学的方法としては、例えば、ラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイ、発光イムノアッセイ、免疫沈降法、免疫比濁法などを挙げるこ

とができるが、好ましくはエンザイムイムノアッセイであり、特に好ましいものは酵素結合免疫吸着定量法(enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) (例えば、sandwich ELISA) である。ELISA などの上述した免疫学的方法は当業者に公知の方法により行うことが可能である。

- 5 抗 GPC3 抗体を用いた一般的な検出方法としては、例えば、抗 GPC3 抗体を支持体に固定し、ここに被検試料を加え、インキュベートを行い抗 GPC3 抗体と GPC3 タンパク質を結合させた後に洗浄して、抗 GPC3 抗体を介して支持体に結合した GPC3 タンパク質を検出することにより、被検試料中の GPC3 タンパク質の検出を行う方法を挙げることができる。
- 10 抗 GPC3 抗体と GPC3 タンパク質との結合は、通常、緩衝液中で行われる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、Tris 緩衝液などが使用される。また、インキュベーションの条件としては、すでによく用いられている条件、例えば、4℃～室温にて1時間～24時間のインキュベーションが行われる。インキュベート後の洗浄は、GPC3 タンパク質と抗 GPC3 抗体の結合を妨げないものであれば何でもよく、例えば、Tween20 等の界面活性剤を含む緩衝液などが使用される。
- 15

- 本発明の GPC3 タンパク質検出方法においては、GPC3 タンパク質を検出したい被検試料の他に、コントロール試料を設置してもよい。コントロール試料としては、GPC3 タンパク質を含まない陰性コントロール試料や GPC3 タンパク質を含む陽性コントロール試料などがある。この場合、GPC3 タンパク質を含まない陰性コントロール試料で得られた結果、GPC3 タンパク質を含む陽性コントロール試料で得られた結果と比較することにより、被検試料中の GPC3 タンパク質を検出することが可能である。また、コントロール試料および被検試料の検出結果を数値として得、それらの数値を比較することにより、被検試料に含まれる GPC3 タンパク質を定量的に検出することも可能である。
- 20
- 25

抗 GPC3 抗体を介して支持体に結合した GPC3 タンパク質の検出の好ましい態様として、標識物質で標識された抗 GPC3 抗体を用いる方法を挙げることができる。例えば、支持体に固定された抗 GPC3 抗体に被検試料を接触させ、洗浄後に、GPC3 タンパク質を特異的に結合する標識抗体を用いて GPC3 を検出

することができる。

抗 GPC3 抗体の標識は通常知られている方法により行うことが可能である。

標識物質としては、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、放射性物質などの当業者に公知の標識物質を用いることが可能であり、具体的な例としては、ラジ

- 5 オアイソトープ(^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I など)、フルオレセイン、ローダミン、
ダンシルクロリド、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ホースラディ
10 ャッシュパーオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシ
ダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ビオチンなどを挙げることができる。標識
物質としてビオチンを用いる場合には、ビオチン標識抗体を添加後に、アルカリ
ホスファターゼなどの酵素を結合させたアビジンをさらに添加することが好まし
い。

- 具体的には、抗 GPC3 抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗
GPC3 抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐ
15 ため、例えば BSA などブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレート
に加える。インキュベートの後、洗浄し、標識抗 GPC3 抗体を加える。適度な
インキュベーションの後、プレートを洗浄し、プレートに残った標識抗 GPC3
抗体を検出する。タンパク質の検出は当業者に公知の方法により行うことができ、
例えば、放射性物質による標識の場合には液体シンチレーションや RIA 法によ
20 り検出することができる。酵素による標識の場合には基質を加え、基質の酵素的
変化、例えば発色を吸光度計により検出することができる。蛍光物質の場合には
蛍光光度計により検出することができる。

本発明の GPC3 タンパク質検出方法の特に好ましい態様として、ビオチンで
標識された抗 GPC3 抗体およびアビジンを用いる方法を挙げることができる。

- 25 具体的には、抗 GPC3 抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗
GPC3 抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐ
ため、例えば BSA などブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレート
に加える。インキュベートの後、洗浄し、ビオチン標識抗 GPC3 抗体を加える。
適度なインキュベーションの後、プレートを洗浄し、アルカリホスファターゼ、

ペルオキシダーゼなどの酵素と結合したアビジンを加える。インキュベーション後、プレートを洗浄し、アビジンに結合している酵素に対応した基質を加え、基質の酵素的変化などを指標に GPC3 タンパク質を検出する。

- 5 本発明の GPC3 タンパク質検出方法の他の態様として、GPC3 タンパク質を特異的に結合する一次抗体、および該一次抗体を特異的に結合する二次抗体を用いる方法を挙げることができる。例えば、支持体に固定された抗 GPC3 抗体に被検試料を接触させ、インキュベーションした後、洗浄し、洗浄後に結合している GPC3 タンパク質を、一次抗 GPC3 抗体および該一次抗体を特異的に結合する二次抗体により検出する。この場合、二次抗体は好ましくは標識物質により標識されている。
- 10

- 具体的には、抗 GPC3 抗体を含む溶液をプレートなどの支持体に加え、抗 GPC3 抗体を固定する。プレートを洗浄後、タンパク質の非特異的な結合を防ぐため、例えば BSA などブロッキングする。再び洗浄し、被検試料をプレートに加える。インキュベーションの後、洗浄し、一次抗 GPC3 抗体を加える。適度な
- 15 インキュベーションの後、プレートを洗浄し、次いで一次抗体を特異的に結合する二次抗体を加える。適度なインキュベーションの後、洗浄して、プレートに残った二次抗体を検出する。二次抗体の検出は前述の方法により行うことができる。

医薬組成物

- 20 別の観点においては、本発明は、本発明の抗体を含有する医薬組成物を提供する。本発明の抗体を含有する医薬組成物は癌などの細胞増殖に関連する疾患の治療および／または予防に有用であり、特に肝臓の治療および／または予防に有用である。本発明の抗体を医薬組成物として用いる場合には、当業者に公知の方法で製剤化することが可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し
- 25 得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製

剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量を投与しうよう選択する。

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

5 注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えば D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

10 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

15 投与は好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の処方は、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与することができる。

また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。抗体または抗体をコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の投与量としては、
20 例えば、一回につき体重 1kg あたり 0.0001mg から 1000mg の範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり 0.001~100000mg/body の範囲で投与量を選ぶことができるが、これらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。
25

本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願 2004-203637 号の明細書および図面に記載の内容は全て本明細書の一部としてここに引用する。

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

実施例

5 実施例 1

ヒトグリピカン 3 (GPC3) の cDNA クローニング

ヒト GPC3 をコードする全長 cDNA は、大腸癌細胞株 Caco2 より常法により調製した 1st strand cDNA を鋳型とし、Advantage2 kit (CLONTECH 社) を用いた PCR 反応により増幅した。

- 10 すなわち、2 μ l の Caco2 由来 cDNA、1 μ l のセンスプライマー (GATATC-ATGGCCGGGACCGTGCGCACCGCGT : 配列番号 1)、1 μ l のアンチセンスプライマー (GCTAGC-TCAGTGCACCAGGAAGAAGAAGCAC : 配列番号 2)、5 μ l の Advantage2 10xPCR buffer、8 μ l の dNTP mix (1.25 mM)、1.0 μ l の Advantage polymerase Mix を含む 50 μ l の反応液を、94 $^{\circ}$ C で 1 分、63 $^{\circ}$ C で
15 30 秒、68 $^{\circ}$ C で 3 分からなるサイクルを 35 回行った。PCR 反応による増幅産物は pGEM-T Easy VectorSystem I (Promega 社) を用いて TA ベクター pGEM-T easy に挿入した。ABI3100 DNA シーケンサーを用い配列の確認を行った結果、ヒト GPC3 の全長をコードする cDNA を単離した。配列番号 3 で表される配列はヒト GPC3 遺伝子の塩基配列を、配列番号 4 で表される配列はヒト
20 ト GPC3 タンパク質のアミノ酸配列を示す。

実施例 2

可溶型 GPC3 の作製

- 抗 GPC3 抗体作製のための免疫タンパク質として、C 末端側の疎水性領域
25 (564-580 アミノ酸) を欠損させた可溶型 GPC3 タンパク質を作製した。

完全長ヒト GPC3 cDNA を鋳型としてアンチセンスプライマー (ATA GAA TTC CAC CAT GGCCGG GAC CGT GCG C : 配列番号 5) と EcoRI 認識配列、Kozak 配列を加えたセンスプライマー (ATA GGA TCC CTT CAG CGG GGA ATG AAC GTT C : 配列番号 6) を用いて PCR を行った。得られた PCR 断片

- (1711bp)を pCXND2-Flag にクローニングした。pCXND2-Flag は、pCXN2(Niwa ら、Gene 1991 ; 108 ; 193-199)の HindIII 部位に pCHOI (Hirata ら、FEBS letter 1994 ; 356 ; 244-248) の DHFR 遺伝子発現領域を挿入し、また、マルチクローニングサイトの下流に Flag タグ配列を付加し、
- 5 Flag タグ付加タンパクとして発現されるよう設計した。作製された発現プラスミド DNA を CHO 細胞 DXB11 株へ導入し、500 μ g/mL Geneticin での選抜により、可溶型 GPC3 高発現 CHO 株を得た。1700 cm² ローラーボトルを用い可溶型 GPC3 高発現 CHO 株の大量培養を行い、培養上清を回収し精製を行った。培養上清を DEAE sepharose Fast Flow (Amersham 社)にチャージし、洗浄後、
- 10 500mM NaCl を含むバッファにより溶出した。次に、Anti-Flag M2 agarose affinity gel (SIGMA 社)を用いてアフィニティー精製を行った。溶出は 200 μ g/mL の FLAG ペプチドにより行った。Centriprep-10(Millipore 社)による濃縮後、Superdex 200 HR 10/30(Amersham 社)によるゲルろ過を行い FLAG ペプチドを除去した。最後に DEAE sepharose Fast Flow カラムを用いて濃縮し、
- 15 同時に Tween20 を含まない PBS (500mM の NaCl を含む) で溶出を行うことによりバッファ置換を行った。

実施例 3

可溶型 GPC3 コアタンパク質の作製

- 20 GPC3 はヘパラン硫酸による修飾を受け巨大分子となる。抗 GPC3 抗体のスクリーニングにおいてヘパラン硫酸に対する抗体を排除する為、ヘパラン硫酸付加部位に点変異を導入した可溶型 GPC3 コアタンパク質を作製し、スクリーニングに用いた。

- 上記可溶型 GPC3 (1-563) を鋳型とし、アッセンブリーPCR 法によって 495
- 25 番目と 509 番目の Ser を Ala に置換させた cDNA を作製した。この際、C 末端に His タグが付加されるようにプライマーを設計し、得られた cDNA を pCXND3 ベクターにクローニングした。pCXND3 は、pCXN2 の HindIII 部位に pCHOI の DHFR 遺伝子発現部位を挿入して作製した。作製された発現プラスミド DNA を DXB11 株へ導入し、500 μ g/mL Geneticin での選抜により、可

溶型 GPC3 コアタンパク質高発現 CHO 株を得た。

1700 cm² ローラーボトルを用い大量培養を行い、培養上清を回収し精製を行った。培養上清を Q sepharose Fast Flow (Amersham 社) にチャージし、洗浄後、500mM NaCl を含むリン酸バッファにより溶出した。次に、Chelating
5 sepharose Fast Flow (Amersham 社) を用いてアフィニティー精製を行った。
10~150mM のイミダゾールでグラジエント溶出を行った。最後に Q sepharose
Fast Flow を用いて濃縮し、500mM NaCl を含むリン酸バッファにより溶出した。

還元条件下にて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果、70kDa、
10 40kDa、30kDa の 3 つのバンドが得られた。ABI492 protein sequencer
(Applied Biosystems 社) を用いてアミノ酸シーケンスを行った結果、
30kDa のバンドは GPC3 の 359 番目以降、もしくは 375 番目以降のアミノ酸配
列と一致し、GPC3 は Arg358 と Ser359 の間、若しくは Lys374 と Val375 の
間で切断を受け、40kDa の N 末端断片と 30kDa の C 末端側断片に分割してい
15 ることが判明した。

実施例 4

全長ヒト GPC3 発現 CHO 細胞株の作製

フローサイトメトリを用いた結合活性評価用の細胞株を得るために、全長
20 GPC3 を発現する CHO 細胞株の樹立を行った。

10 μ g の全長ヒト GPC3 遺伝子発現ベクターと 60 μ L の SuperFect
(QIAGEN 社) を混合し、複合体を形成させた後に、CHO 細胞 DXB11 株に添
加することにより、遺伝子導入を行った。CO₂ インキュベーターで 24 時間培養
後、終濃度 0.5mg/mL の Geneticin および 10% FBS を含む α MEM (GIBCO
25 BRL 社) を用いて、選抜を開始した。得られた Geneticin 耐性コロニーを集め、
限界希釈法により細胞のクローニングを行った。それぞれの細胞クローンを可溶
化し、抗 GPC3 抗体を用いたウエスタンブロットにより全長ヒト GPC3 の発現
を確認し、安定発現細胞株を取得した。

実施例 5

ELISA による結合活性の評価

可溶型 GPC3 コアタンパク質を $1 \mu\text{g/mL}$ となるようにコーティングバッファ (0.1mol/L NaHCO_3 (pH9.6), 0.02%(w/v) NaN_3) で希釈したものをイムノプレートに加え、 4°C にて一晩放置しコーティングした。希釈バッファ (50 mmol/L Tris-HCl(pH8.1), 1 mmol/L MgCl_2 , 150 mmol/L NaCl , 0.05%(v/v) Tween 20, 0.02%(w/v) NaN_3 , 1%(w/v) BSA) にてブロッキング処理を行った後、抗 GPC3 抗体を加え、室温で 1 時間放置した。リンスバッファ (0.05%(v/v) Tween 20, PBS) にて洗浄後、アルカリホスファターゼ標識した抗マウス IgG 抗体 (ZYMED 社) を加え、室温で 1 時間放置した。リンスバッファにて洗浄後、SIGMA104 (SIGMA 社) を 1 mg/mL となるように基質バッファ (50mmol/L NaHCO_3 (pH9.8), 10 mmol/L MgCl_2) に希釈したものを添加し、室温で 1 時間発色させた後、Benchmark Plus (BIO-RAD) を用いて吸光度 (405nm, 参照波長 655nm) を測定した。

実施例 6

可溶型 GPC3 の免疫およびハイブリドーマの選抜

ヒト GPC3 とマウス GPC3 のホモロジーはアミノ酸レベルで 94% の高い相同性を示すため、通常のマウスに免疫しても抗 GPC3 抗体を得難い可能性を考え、自己免疫疾患マウスである MRL/MpJ UmmCrj-lpr/lpr マウス (以下、MRL/lpr マウス、日本チャールズ・リバーより購入) を免疫動物として用いた。7 週齢、もしくは 8 週齢より免疫を開始し、初回免疫には可溶型 GPC3 を $100 \mu\text{g/head}$ となるように調製し、フロイント完全アジュバント (FCA、ベクトンディッキンソン社) を用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。2 週間後に $50 \mu\text{g/head}$ となるように調製したものをフロイント不完全アジュバント (FIA、ベクトンディッキンソン社) でエマルジョン化したものを皮下に投与した。以降 1 週間間隔で追加免疫を合計 5 回行った。その内 2 匹に対し、最終免疫として $50 \mu\text{g/head}$ となるように PBS に希釈し尾静脈内に投与した。最終免疫の 4 日後、脾臓細胞を摘出し、マウスミエローマ細胞 P3-X63Ag8U1 (P3U1、ATCC より

購入)と 2:1 になるように混合し、PEG1500 (ロシュ・ダイアグノスティック社)を徐々に加える事により細胞融合を行った。慎重に RPMI1640 培地 (GIBCO BRL 社)を加え PEG1500 を希釈し、遠心操作により PEG1500 を除去した後、10%FBS 入り RPMI1640 にて懸濁したものを 100 μ L/ウェルとなるように 96 穴培養プレートに播種した。翌日、100 μ L/ウェルとなるように 10% FBS、1 x HAT media supplement (SIGMA 社)、0.5 x BM-Condimed H1 Hybridoma cloning supplement (ロシュ・ダイアグノスティック社)を含む RPMI1640 (以降、HAT 培地)を添加した。2, 3, 5 日後に培養液の半分を HAT 培地に置き換え、7 日後の培養上清を用いてスクリーニングを行った。スクリーニングは可溶型 GPC3 コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いた ELISA により行った。陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した。その結果、GPC3 に対して強い結合活性を有する抗体を 11 クローン (M3C11、M13B3、M1E7、M3B8、M11F1、L9G11、M19B11、M6B1、M18D4、M5B9、M10D2) 取得した。

15

実施例 7

抗 GPC3 抗体のアイソタイプの決定、および精製

アイソタイプは、Immunopure Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (PIERCE 社)を用いた抗原依存的 ELISA により決定した。抗体の精製は、FBS(Ultra low IgG) (GIBCO BRL 社)を添加した HAT 培地にて培養したハイブリドーマの培養上清を、Hi Trap ProteinG HP(Amersham 社)に吸着させた後、結合バッファ (20mM Sodium phosphate (pH7.0)) にて洗浄後、溶出バッファ (0.1M Glycine-HCl (pH2.7)) で溶出した。溶出液は直ちに中和バッファ (1M Tris-HCl(pH9.0)) で中和した。PBS で一昼夜透析を行いバッファ置換した。

25

実施例 8

ELISA による結合活性の評価

取得された抗 GPC3 抗体の結合活性を簡便に評価する為、可溶型 GPC3 コアタンパク質を固相化したイムノプレートに対する抗体濃度依存的な結合を検出し

た。精製抗体を $10 \mu\text{g/mL}$ から 3 倍ずつ 1 2 段階に希釈したものを加え、2 次抗体として抗マウス IgG 抗体を添加し、SIGMA104 による発色を行った。発色の程度は発色時間により変化するので、データは正確に 1 時間後に測定したものを解析した。各抗体は全て濃度依存的な発色を示した。抗体濃度と発色の程度との相関をプロットし、解析ソフト GraphPad Prism を用いて近似曲線を作成し、その EC50 値を結合活性の指標として決定した。図 1 6 に全クローンの EC50 値を示した。

実施例 9

10 フローサイトメトリによる結合活性の評価

1mM EDTA pH8.0 (GIBCO 社)/ PBS にて細胞を剥離し、 1×10^6 細胞/mL になるように FACS バッファ (1% FBS/PBS) に懸濁した。100 μL /ウェルとなるように Multiscreen - HV Filter Plates (Millipor 社) に分注し、遠心操作にて上清を除去した。適当な濃度に希釈した抗 GPC3 抗体を加え、氷上にて 30 分間反応させた。細胞を FACS バッファにて 1 回洗浄し、FITC 標識抗マウス IgG 抗体を添加し、氷上にて 30 分間反応させた。反応後、500rpm で 1 分間遠心し、上清を除き、FACS バッファ 400 μL に懸濁し、フローサイトメトリーに供した。フローサイトメーターは EPICS ELITE ESP (Beckman Coulter) を用いた。前方散乱光 (forward scatter) および側方散乱光 (side scatter) のヒストグラムにて生細胞集団にゲートを設定した。図 1 に示すように抗 GPC3 抗体 (M3C11、M11F1) は GPC3 を発現させた CHO 細胞に強く結合し、親株である CHO 細胞には結合しないことから、細胞膜上に提示された GPC3 に特異的に結合する事が判明した。また、肝癌細胞株である HepG2 (ATCC より購入)、HuH-7 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入) に対して結合を示したことから、肝細胞癌を特異的に認識する可能性が示された。可溶型 GPC3 免疫マウス由来クローンのフローサイトメトリによる結合活性については抗体濃度 $5 \mu\text{g/mL}$ におけるヒストグラムの X-mode 値を図 1 6 に示す。

実施例 10

競合 ELISA によるエピトープ分類

得られた抗体についてエピトープによる分類を行う為、競合 ELISA を実施した。抗体のビオチン化は Biotin Labeling Kit (Roche 社) を用いて行った。可溶型 GPC3 コアタンパク質を $1\mu\text{g/mL}$ となるようにコーティングバッファで希釈したものを $100\mu\text{L}$ /ウエルとなるように加え、一晚 4°C で保管しコーティングした。翌日 $200\mu\text{L}$ の基質バッファを加えブロッキングを行った。 4°C で一晚以上放置したプレートへ抗 GPC3 抗体を $100\mu\text{L}$ /ウエルとなるように加え、室温で 1 時間反応させた。その後プレートの洗浄なしに $10\mu\text{g/mL}$ のビオチン標識した抗 GPC3 抗体 $10\mu\text{L}$ を加えさらに 1 時間反応させた。 $300\mu\text{L}$ /ウエルのリンスバッファで 3 回洗浄し、希釈バッファで 1000 倍に希釈した AP-ストレプトアビジンコンジュゲート(ZYMED 社)を $100\mu\text{L}$ /ウエルとなるように加え、室温で 1 時間反応させた。 $300\mu\text{L}$ /ウエルのリンスバッファで 5 回洗浄し、SIGMA104 を 1mg/mL となるように基質バッファで希釈したものを $100\mu\text{L}$ /ウエルとなるように加えた。1 時間室温でインキュベートした後、吸光度 (405nm , 参照波長 655nm) を測定した。

図 2 に競合 ELISA の結果を示す。ビオチン化抗体の結合を 50%以上競合的に阻害した抗体については、エピトープが立体的に近傍であると判断した。8 種類のビオチン化抗体の結合に対する競合的な発色の阻害のパターンによりグループ分けした結果、可溶型 GPC3 免疫マウス由来の 11 クローンは 5 つのグループ (a, b, c, d, e) に分類された (図 16)。

実施例 11

ウエスタンブロッティングによるエピトープ分類

可溶型 GPC3 コアタンパク質を還元条件下にて 10%SDS-PAGE mini (TEFCO 社) にチャージし電気泳動後、Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (BIO-RAD 社) を用いてイモビロン-P (Millipore 社) へ移した。膜を TBS-T (0.05% Tween20, TBS) で軽く洗った後、5%スキムミルク入り TBS-T で 1 時間振とうした。TBS-T で約 10 分間振とうした後、1%スキムミルク入り TBS-T で希釈した各抗 GPC3 抗体を加え 1 時間振とうし

た。TBS-T で洗った後 1%スキムミルク入り TBS-T で希釈した HRP-抗マウス IgG 抗体 (Amersham 社) で 1 時間振とう後、TBS-T で洗った。発色は ECL-Plus (Amersham 社)を用いて行い、Hyperfilm ECL (Amersham 社)を用いて検出した。

- 5 図 3 に示すように、L9G11 は 40kDa 付近のバンドに結合することから N 端側結合抗体であると判断された。M3C11 は 30kDa 付近のバンドに結合することから C 端側に結合する抗体と判断した。競合 ELISA で c, d, e に属する抗体は全て N 末端に結合し、a, b は全て C 末端に結合した (図 1 6)。L9G11 は他の N 端側結合抗体と比較してウエスタンブロッティングの検出感度が高く、N
- 10 端側断片をウエスタンブロッティングにより検出するにあたって有用な抗体であると考えられた。

実施例 1 2

分泌型 GPC3 の検出

- 15 GPC3 が 358 番目のアミノ酸部位、若しくは 374 番目のアミノ酸部位で切断される事実を見出し、分泌型 GPC3 が肝癌患者の血中に分泌されるという仮説を立てた。そこで分泌型 GPC3 を検出する為、GPC3 サンドイッチ ELISA 系を構築した。

- 20 イムノプレートに 10 μ g/mL となるように抗 GPC3 抗体をコートし、基質バッファを用いてブロッキングを行った。室温で数時間後、あるいは 4℃で一晩保管後、HepG2 の培養上清を加え 1 時間室温でインキュベートした。300 μ L/ウェルのリンスバッファで 3 回洗浄後、10 μ g/mL となるように希釈したビオチン標識した抗 GPC3 抗体を加え 1 時間室温でインキュベートした。300 μ L/ウェルのリンスバッファで 3 回洗浄後、AP-ストレプトアビジンを加え、1 時間室温で
- 25 インキュベートした。300 μ L/ウェルのリンスバッファで 5 回洗浄した後、添付のプロトコールに従い AMPAK (DAKO 社)を用いて発色させ、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。N 端断片に結合する抗体 (M6B1、M19B11、M18D4) と C 端断片に結合する抗体 (M3C11、M13B3、M3B8) を組み合わせ 5 種類のサンドイッチ ELISA 系を構築した。いずれの組み合わせも分泌型

GPC3 を用いたスタンダード曲線では同等の感度を示した。HepG2 の培養上清を用いて評価した結果、N 端断片に結合する抗体の組み合わせで $1\mu\text{g/mL}$ 程度と高濃度で分泌型 GPC3 が検出された（図 4）。C 端に結合する抗体の組み合わせでは検出濃度が低かったことから、分泌型 GPC3 では N 端断片が優位に存在すると考えられた。

次に、抗 GPC3 抗体を用いて HepG2 の培養上清の免疫沈降を行い、分泌型 GPC3 の検出を行った。N 端断片に結合する M10D2 を用いた場合、40kDa の分泌型 GPC3 が検出された（図 5）。それに対し C 端断片に結合する M1E7 を用いた場合、分泌型 GPC3 は検出されなかった。取得した全 GPC3 抗体について免疫沈降実験を行った結果、N 端断片に結合する全ての抗体は分泌型 GPC3 を強く検出し、C 端断片に結合する抗体では検出されないか、弱く検出された（図 16）。免疫沈降により分泌型 GPC3 を検出し得る抗体は肝細胞癌の診断用抗体として有用であると考えられる。また、分泌型 GPC3 を検出しにくい抗体は、ADCC 活性、CDC 活性を有する治療用抗体として開発する上で、血液中の分泌型 GPC3 にトラップされずに肝細胞癌へ移行し得る点で有用であると考えられた。

実施例 1 3

抗 GPC3 抗体可変領域のクローニング

抗 GPC3 抗体産生ハイブリドーマより抽出した Total RNA を用いて、抗 GPC3 抗体可変領域を RT-PCR 法によって増幅した。Total RNA は、RNeasy Plant Mini Kits (QIAGEN 社) を用いて 1×10^7 細胞のハイブリドーマより抽出した。 $1\mu\text{g}$ の Total RNA を使用して、SMART RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH 社)、以下の合成オリゴヌクレオチド：マウス IgG1 定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチド MHC-IgG1GGG CCA GTG GAT AGACAG ATG（配列番号 7）マウス IgG2a 定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチド MHC-IgG2aCAG GGG CCA GTG GAT AGA CCG ATG（配列番号 8）マウス IgG2b 定常領域配列に相補的な合成オリゴヌクレオチド MHC-IgG2bCAG GGG CCA GTG GAT AGA CTG ATG（配列番号 9）ま

たはマウス κ 鎖定常領域塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチド kappaGCT CAC TGG ATG GTG GGA AGA TG (配列番号 10) を用い、5' 末端側遺伝子断片を増幅した。

5 逆転写反応は 42℃で 1 時間 30 分間反応した。PCR 溶液 50 μ L は、5 μ L の 10×Advantage 2PCR Buffer、5 μ L の 10×Universal Primer A Mix、0.2mM dNTPs (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)、1 μ L の Advantage 2 Polymerase Mix (以上、CLONTECH 社製)、2.5 μ L の逆転写反応産物、10 pmole の合成オリゴヌクレオチド MHC-IgG1、MHC-IgG2a、MHC-IgG2b または kappa を含
10 有した。PCR は、94℃の初期温度にて 30 秒間そして 94℃にて 5 秒間、72℃にて 3 分間のサイクルを 5 回反復し、94℃にて 5 秒間、70℃にて 10 秒間、72℃にて 3 分間のサイクルを 5 回反復し、さらに 94℃にて 5 秒間、68℃にて 10 秒間、72℃にて 3 分間のサイクルを 25 回反復した。最後に反応産物を 72℃で 7 分間加熱した。各 PCR 産物は QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN 社製) を用いて、アガロースゲルから精製した後、pGEM-T Easy ベクター (Promega 社
15 製) ヘクローニングし、塩基配列を決定した。

M3C11、M13B3、M1E7、M3B8、M11F1、M19B11、M6B1、M18D4、M5B9、M10D2、L9G11 の H 鎖可変領域の塩基配列をそれぞれ配列番号 11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 に、アミノ酸配列をそれぞれ配列番号 22、23、24、25、26、27、28、29、30、
20 31、32 に、L 鎖可変領域の塩基配列を配列番号 33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43 に、アミノ酸配列をそれぞれ配列番号 44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54 に示す。

実施例 14

25 GST 融合蛋白を用いたエピトープ分類

C 端断片に結合する抗体についてはエピトープの詳細な解析を行う為、段階的に短くした GPC3C 端断片ペプチドと GST の融合タンパク質 GC-1 (Ser495 から Lys563)、GC-2 (Gly510 から Lys563)、GC-3 (Ala524 から Lys563) GC-4 (Gly537 から Lys563)、GC-5 (Ser550 から Lys563) を作製した。

GPC3 C 末端領域を pGEX-4T-3 (Amersham 社) ヘクローニングし GST の C 末端側に GPC3 C 末端領域を連結したプラスミド DNA を構築した。プラスミド DNA を DH5 α へ導入し形質転換体を得、対数増殖期にある形質転換体の培養物に 1mM となるように IPTG を加えることにより GST 融合タンパク質の発現を誘導し、2 時間培養後に菌体を回収した。超音波処理により破碎後、XL-80 超遠心分離機(Beckman, ロータ 70.1Ti)を用い 35,000rpm で 30 分遠心後の培養上清を回収し、GST Purification Modules (Amersham 社)を用いて精製した。このようにして精製した GST 融合タンパク質を還元条件下にて SDS-PAGE により分離後、抗 GPC3 抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 6) 。 M3C11、M1E7 は GC-1、2 を検出し、GC-3、4、5 を検出しなかった。これら抗体のエピトープは、GC-2 の領域に含まれており、GC-3 の領域では不十分な領域であるといえる。M3B8、M11F1 は GC-1、2、3、4 を検出し、GC-5 を検出しなかった。これら抗体のエピトープは、GC-4 の領域に含まれており、GC-5 の領域では不十分な領域であるといえる。各抗体の結合し得る GST 融合蛋白の最小領域について図 1 6 のウエスタンブロッティングの項に記載した。

実施例 1 5

抗 GPC3 マウス-ヒトキメラ抗体の作製

抗 GPC3 抗体のH鎖およびL鎖可変領域配列をヒト IgG1 および κ 鎖定常領域配列に連結した。各抗体のH鎖可変領域の5'末端側塩基配列に相補的でコザック配列を有する合成オリゴヌクレオチドおよび NheI 部位を有する3'末端側塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をヒト IgG1 定常領域が pBluescript KS+ベクター (東洋紡社) に挿入されている pB-CH ベクターにクローニングした。NheI 部位により、マウス H鎖可変領域とヒトH鎖 (γ 1 鎖) 定常領域が連結している。作製されたH鎖遺伝子断片を発現ベクターpCXND3 にクローニングした。また、各抗体のL鎖可変領域の5'末端側塩基配列に相補的でコザック配列を有する合成オリゴヌクレオチドおよび BsiWI 部位を有する3'末端側塩基配列に相補的な合成オリゴヌクレオチドを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をヒト κ 鎖定常領域

が pBluescript KS+ベクター（東洋紡社）に挿入されている pB-CL ベクターにクローニングした。BsiWI 部位により、ヒト L 鎖可変領域と定常領域が連結している。作製された L 鎖遺伝子断片を発現ベクター pUCAG クローニングした。本ベクター pUCAG は、pCXN（Niwa ら、Gene 1991;108:193-200）を制限酵素 BamHI で消化して得られる 2.6kbp の断片を pUC19 ベクター（東洋紡社）の制限酵素 BamHI 部位に連結し、クローニングしたベクターである。

抗 GPC3 マウスーヒトキメラ抗体発現ベクターを作製するために、L 鎖遺伝子断片が挿入された pUCAG ベクターを制限酵素 HindIII（宝酒造社）で消化して得られる遺伝子断片を H 鎖遺伝子が挿入された pCXND3 の制限酵素 HindIII 切断部位に連結し、クローニングした。本プラスミドは動物細胞内でネオマイシン耐性遺伝子、DHFR 遺伝子、抗 GPC3 マウスーヒトキメラ抗体遺伝子を発現する。

抗体を安定に発現する CHO 細胞（DG44 株）の作製は次のようにして行った。Gene PulserII（Bio Rad 社製）を用いたエレクトロポレーション法により細胞に遺伝子を導入した。25 μ g の各抗 GPC3 マウスーヒトキメラ抗体発現ベクターと PBS に懸濁した CHO 細胞（ 1×10^7 細胞 / ml）の 0.75ml を混合したものを氷上で 10 分間冷却し、キュベットに移した後に 1.5kV、25 μ FD の容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を、HT supplement（Invitrogen 社）を 1 倍濃度で含む CHO-S-SFMII 培地（Invitrogen 社）40mL に懸濁した。同様の培地で 50 倍希釈溶液を作製し、96 ウェル培養用プレートに 100 μ l / ウェルで分注した。CO₂ インキュベーター（5 % CO₂）で 24 時間培養後、Geneticin（Invitrogen 社）を 0.5mg/mL になるように添加して 2 週間培養した。Geneticin 耐性を示す形質転換細胞のコロニーが観察されたウェルの培養上清中を取り出し、IgG 量について以下に示す濃度定量法で測定した。高産生細胞株を順次拡大培養し、抗 GPC3 マウスーヒトキメラ抗体安定発現細胞株を取得し、大量培養を行い、培養上清を得た。各抗 GPC3 マウスーヒトキメラ抗体の精製は、Hi Trap ProteinG HP（Amersham 社）を用いて行った。

実施例 1 6

補体依存性細胞障害活性(CDC 活性)の測定 1 6. 1 ヒトアルブミン・ペロナール・バッファ (HAVB) の作製

NaCl (特級、和光純薬工業株式会社) 12.75 g、Na-バルビタール (特級、和光純薬工業株式会社) 0.5625 g、バルビタール (特級、和光純薬工業株式会社) 0.8625 g をミリQ水に溶解し 200 mL とした後、オートクレーブ処理 (121℃、20 分間) した。オートクレーブ処理した 100 mL の温ミリQ水を加え、pH7.43 を確認した (推奨 pH7.5)。これを 5×ペロナールバッファとした。CaCl₂・2H₂O (特級、純正化学株式会社) 0.2205 g を 50 mL ミリQ水に溶解し 0.03 mol/L とし、CaCl₂ 溶液とした。MgCl₂・6H₂O (特級、純正化学株式会社) 1.0165 g を 50 mL ミリQ水に溶解し 0.1 mol/L とし、MgCl₂ 溶液とした。5×ペロナールバッファ 100 mL、ヒト血清アルブミン (ブミネート (登録商標) 25%、ヒト血清アルブミン濃度 250 mg/mL、バクスター株式会社) 4 mL、CaCl₂ 溶液 2.5 mL、MgCl₂ 溶液 2.5 mL、KCl (特級、純正化学株式会社) 0.1 g、グルコース (D(+)-グルコース、ブドウ糖無水、特級、和光純薬工業株式会社) 0.5 g をミリQ水に溶解し 500 mL とした。これを HAVB とした。ろ過滅菌後、設定温度 5℃にて保存した。

1 6. 2 標的細胞の調製

実施例 4 で作製された全長ヒト GPC3 発現 CHO 細胞は、10%FBS と 0.5mg/mL Geneticin(GIBCO)を添加した α -MEM 核酸 (+) 培地 (GIBCO) で培養し、細胞剥離緩衝液(InvitrogenCorp)を用いてディッシュから剥離して、96 ウェル平底プレート(Falcon)の各ウェルに 1×10⁴ 細胞/ウェルで分注し、3 日間培養した。培養後、5.55MBq のクロム-51 を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中 37℃ 1 時間培養し、この細胞を HAVB で 2 回洗浄し、50 μ L の HAVB を加え標的細胞とした。

1 6. 3 クロム遊離試験 (CDC 活性)

各キメラ抗体を HAVB で希釈して 40 μ g/mL の抗体溶液とした。標的細胞に

- 抗体溶液を 50 μ L ずつ添加し、氷上にて 15 分間静置した。続いて、各ウェルに HAVB にて希釈した、健常者ボランティア末梢血由来ヒト血清を終濃度 25% になるよう 100 μ L ずつ添加し（抗体の終濃度 10 μ g/mL）、5%炭酸ガスインキュベーター中に 37°C で 90 分間静置した。プレートを遠心分離後、各ウェルより上清を 100 μ L ずつ回収し、ガンマカウンターにて放射活性を測定した。下記により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率 (\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

- A は各ウェルにおける放射活性 (cpm)、B は標的細胞に 2% NP-40 水溶液 (Nonidet P-40、Code No.252-23、ナカライテスク株式会社) を 100 μ L、HAVB を 50 μ L 添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値、C は標的細胞に HAVB を 150 μ L 添加したウェルにおける放射活性 (cpm) の平均値を示す。試験は三重に行い、CDC 活性 (%) について平均値および標準偏差を算出した。

- その結果を図 7 に示した。9 種類の抗 GPC3 キメラ抗体のうち、C 末端認識抗体である M3B8 と M11F1 が GPC3 発現 CHO 細胞に対し強い CDC 活性を示したのに対し、その他の抗体では CDC 活性が認められなかった。M3B8 と M11F1 は Competition ELISA において「b」と呼ばれるグループに属しており、強い CDC 活性を示すのに重要なエピトープを見出す事ができた。

20 実施例 17

ヒト末梢血由来 PBMC を用いた ADCC 活性の測定 17. 1 ヒト PBMC 溶液の調製

- 健常人よりヘパリン加採血した末梢血を、PBS(-)で 2 倍に希釈し、Ficoll-Paque TM PLUS (Amersham 社)に重層した。これを遠心 (500 \times g、30 分間、20°C) した後、単核球画分である中間層を分取した。3 回洗浄後、10% FBS/RPMI に懸濁し、ヒト PBMC 溶液とした。

17. 2 標的細胞の調製

10%FBS/RPMI1640 培地で培養した HepG2 細胞を、トリプシン-

EDTA(Invitrogen 社)を用いてディッシュから剥離し、96 ウェル U 字底プレート(Falcon)の各ウェルに 1×10^4 細胞/ウェルで分注し、2 日間培養した。実施例 4 で作製された全長ヒト GPC3 発現 CHO 細胞は、10%FBS と 0.5mg/mL Geneticin(GIBCO)を添加した α -MEM 核酸 (+) 培地 (GIBCO) で培養し、

5 細胞剥離緩衝液(Invitrogen Corp)を用いてディッシュから剥離して、96 ウェル 平底プレート(Falcon)の各ウェルに 1×10^4 細胞/ウェルで分注し、3 日間培養した。両細胞は培養後、それぞれ 5.55MBq のクロム-51 を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中 37℃で 1 時間培養し、この細胞を培地で 1 回洗浄し、50 μ L の 10% FBS/RPMI 1640 培地を加え標的細胞とした。

10

17. 3 クロム遊離試験 (ADCC 活性)

標的細胞に各濃度に調製した抗体溶液 50 μ L を添加し、氷上で 15 分反応させた後に、ヒト PBMC 溶液 100 μ L (5×10^5 細胞/ウェル) を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中 37℃4 時間培養し、培養後、プレートを遠心分離し、培養

15 上清 100 μ L 中の放射活性をガンマカウンターで測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率(\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

A は各ウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、B は標的細胞に 2% NP-40 水溶液(Nonidet P-40、Code No.252-23、ナカライテスク株式会社)を 100 μ L、

20

10%FBS/RPMI 培地を 50 μ L 添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、C は標的細胞に 10%FBS/RPMI 培地を 150 μ L 添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。試験は三重に行い、ADCC 活性 (%) について平均値および標準偏差を算出した。その結果を図 8 に示した。9 種類の抗 GPC3 キメラ抗体のうち、C 末端認識抗体が強い ADCC 活性を示す傾向が認められた。

25

実施例 18

GC-3 の免疫およびハイブリドーマの選抜

得られた抗 GPC3 抗体のうち、M11F1、M3B8 のみが強い CDC 活性を示したことから、CDC 活性にはエピトープ依存性があることが判明した。ADCC 活

性、CDC 活性を併せもつ抗体の取得を目的とし、M11F1、M3B8 のエピトープを含む GST 融合タンパク質である GC-3 を用いて免疫を行った。GC-3 は上記方法により大量に精製し、Superdex75 (Amersham 社) を用いてゲルろ過を行い、バッファを PBS に置換したものを免疫蛋白として使用した。Balb/c (日本チャールズリバーより購入) 3 匹、MRL/lpr 3 匹を、上記方法に従い GC-3 で免疫した。初回免疫には GC-3 を $100 \mu\text{g/head}$ となるように調製し、FCA を用いてエマルジョン化したものを皮下に投与した。2 週間後に $50 \mu\text{g/head}$ となるように調製したものを FIA でエマルジョン化したものを皮下に投与した。5 回免疫の後、全マウスに対し最終免疫 ($50 \mu\text{g/head}$) を尾静脈内に行った。細胞融合を行い、可溶型 GPC3 コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いた ELISA によりスクリーニングを行った。陽性クローンについては限界希釈法によりモノクローン化した。その結果、GPC3 に対して強い結合活性を有する抗体を 5 クローン (GC199、GC202、GC33、GC179、GC194) 取得した。

ハイブリドーマの培養上清より Hi Trap ProteinG HP を用いて抗体を精製し、上記方法に従い解析を行った。可溶型 GPC3 コアタンパク質を固相化したイムノプレートを用いた ELISA により EC_{50} 値を算出し、フローサイトメトリにより $5 \mu\text{g/mL}$ でのヒストグラムの X-mode 値を測定した (図 17)。競合 ELISA によるエピトープ分類の結果、b に属するもの (GC199、GC202、GC33) と新しいエピトープグループ f (GC179、GC194) に分類された。GST 融合タンパク質を用いたエピトープ分類の結果、GC199、GC202、GC33 は GC-1、2、3、4 を検出し、GC-5 を検出しなかった。これら抗体のエピトープは、M11F1、M3B8 のエピトープと同様に、GC-4 の領域に含まれており、GC-5 の領域では不十分な領域であるといえる。一方、GC179、GC194 は GC-1、2、3 を検出し、GC-4、5 を検出しなかった。これら抗体のエピトープは、GC-3 の領域に含まれており、GC-4 の領域では不十分な領域であるといえる。各抗体の結合し得る GST 融合蛋白の最小領域について図 17 のウエスタンブロッティングの項に記載した。

GC199、GC202、GC33、GC179、GC194 について上記方法に従い H 鎖、L 鎖の可変領域をクローニングし、配列を決定した。GC194 の L 鎖については 2

種類の配列がクローニングされた。GC199、GC202、GC33、GC179、GC194の H 鎖可変領域の塩基配列をそれぞれ配列番号 55、56、57、58、59に、アミノ酸配列をそれぞれ配列番号 60、61、62、63、64に示す。GC199、GC202、GC33、GC179、GC194(1)、GC194(2)の L 鎖可変領域の塩
5 基配列をそれぞれ配列番号 65、66、67、68、69、70に、アミノ酸配列をそれぞれ配列番号 71、72、73、74、75、76に示す。

さらに、これらのアミノ酸配列を既知の抗体のアミノ酸配列のデータベースと比較して相同性を調べることにより、CDR領域を以下のとおり決定した。

抗体	CDR	アミノ酸配列	配列 番号
M13B3(H)	CDR1	NYAMS	103
	CDR2	AINNNGDDTYYLDTVKD	104
	CDR3	QGGAY	105
M3B8(H)	CDR1	TYGMGVG	106
	CDR2	NIWWYDAKYYNSDLKS	107
	CDR3	MGLAWFAY	108
M11F1(H)	CDR1	IYGMGVG	109
	CDR2	NIWWNDDKYYSALKS	110
	CDR3	IGYFYFDY	111
M5B9(H)	CDR1	GYWMH	112
	CDR2	AIYPGNSDTNYNQKFKG	113
	CDR3	SGDLTGGLAY	114
M6B1(H)	CDR1	SYAMS	115
	CDR2	AINSNGGTTYYPDTMKD	116
	CDR3	HNGGYENYGWFAF	117
M10D2(H)	CDR1	SYWMH	118
	CDR2	EIDPSDSYTYYNQKFRG	119
	CDR3	SNLGDGHYRFPAPY	120
L9G11(H)	CDR1	SYWMH	118
	CDR2	TIDPSDSETHYNLQFKD	121
	CDR3	GAFYSSYSYWAFAF	122
GC33(H)	CDR1	DYEMH	123
	CDR2	ALDPKTGDTAYSQKFKG	124
	CDR3	FYSYTY	125
GC179(H)	CDR1	INAMN	126
	CDR2	RIRSESNNYATYYGDSVKD	127
	CDR3	EVTTSFAF	128
GC194(H)	CDR1	ASAMN	129
	CDR2	RIRSKSNNYAIYYADSVKD	130
	CDR3	DPGYGPNWFAF	131
GC199(H)	CDR1	DYSMH	132
	CDR2	WINTETGEPTYADDFKG	133
	CDR3	LY	134
GC202(H)	CDR1	TYGMGVG	106
	CDR2	NIWWHDDKYYSALKS	135
	CDR3	IAPRYNKYEGFFAF	136

M13B3(L)	CDR1	KSSQSLLSDGKTYLN	137
	CDR2	LVSRLDS	138
	CDR3	WQGTHFPLT	139
M3B8(L)	CDR1	KASQDINNYLS	140
	CDR2	RANRLVD	141
	CDR3	LQCDEFPPWT	142
M11F1(L)	CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	143
	CDR2	KVSNRFS	144
	CDR3	SQSTHVPWT	145
M5B9(L)	CDR1	RSSKSLHLSNGITYLY	146
	CDR2	QMSNLAS	147
	CDR3	AQNLELPYT	148
M6B1(L)	CDR1	KASQDINKNII	149
	CDR2	YTSTLQP	150
	CDR3	LQYDNLPRT	151
M10D2(L)	CDR1	RASHSISNFLH	152
	CDR2	YASQSIG	153
	CDR3	QQSNIWSLT	154
L9G11(L)	CDR1	RASESVEYYGTSLMQ	155
	CDR2	GASNVES	156
	CDR3	QQSRKVPYT	157
GC33(L)	CDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH	143
	CDR2	KVSNRFS	144
	CDR3	SQNTHVPPT	158
GC179(L)	CDR1	KSSKSLHLSNGNTYLN	159
	CDR2	WMSNLAS	160
	CDR3	MQHIEYPPT	161
GC194(L)1	CDR1	RSSKSLHLSYDITYLY	162
	CDR2	QMSNLAS	147
	CDR3	AQNLELPPT	163
GC194(L)2	CDR1	SASSSVSYMY	164
	CDR2	DTSNLAS	165
	CDR3	QQWSSYPLT	166
GC199(L)	CDR1	KSSQSLLHSDGKTFLN	167
	CDR2	LVSRLDS	168
	CDR3	CQGTHFPRT	169
GC202(L)	CDR1	RSSQSIVHSNGNTYLE	170
	CDR2	KVSNRFS	144
	CDR3	FQGSHVPWT	171

実施例 19

マウス骨髄由来エフェクター細胞を用いた ADCC 活性の測定 19. 1 マウス

5 骨髄由来エフェクター細胞溶液の調製

SCID マウス（日本クレア・オス・10週齢）の大腿骨から骨髓細胞を採取し、10% FBS/RPMI 1640 培地中 5×10^5 個/mL となるよう懸濁し、マウス GM-CSF(PeproTech) およびヒト IL-2 (PeproTech) をそれぞれ 10ng/mL、50ng/mL となるよう添加し、5%炭酸ガスインキュベータ中 37℃で5日培養した。培養後
5 スクレーパーではがして培地で1回洗浄し、10% FBS/RPMI 1640 培地中 5×10^6 /mL となるよう懸濁し、マウス骨髓由来エフェクター細胞溶液とした。

19.2 標的細胞の調製

ヒト肝癌細胞株 HuH-7 は 10%FBS (ThermoTrace 社製) を含む DMEM 培
10 地 (SIGMA 社製) にて維持継代し、Cell Dissociation Buffer (Invitrogen 社) を
用いてディッシュから剥離し、96 ウェル U 字底プレート(Falcon)の各ウェルに
 1×10^4 細胞/ウェルで分注し、1日間培養した。培養後、5.55MBq のクロム-51
を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中 37℃で1時間培養し、この細胞を培地で
1回洗浄し、50 μ L の 10%FBS/RPMI1640 培地を加え標的細胞とした。

15

19.3 クロム遊離試験 (ADCC 活性)

標的細胞に各濃度に調製した抗体溶液 50 μ L を添加し、氷上で15分反応させた後に、マウス骨髓由来エフェクター細胞溶液 100 μ L (5×10^5 細胞/ウェル) を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中 37℃4時間培養し、培養後、プレートを
20 遠心分離し、培養上清 100 μ L 中の放射活性をガンマカウンターで測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率(\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

A は各ウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、B は標的細胞に 2% NP-40 水溶液(Nonidet P-40、Code No.252-23、ナカライテスク株式会社)を 100 μ L、
25 10%FBS/RPMI 培地を 50 μ L 添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、C は標的細胞に 10%FBS/RPMI 培地を 150 μ L 添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。試験は三重に行い、ADCC 活性 (%) について平均値および標準偏差を算出した。

その結果を図9に示した。GC33 抗体は 0.1 μ g/mL 以上の抗体濃度において

ADCC 活性を示し、GC199 抗体と比較して強い活性を示すことが明らかとなった。

実施例 20

5 GC33 抗体のヒト肝癌移植マウスモデルに対する抗腫瘍活性 20.1 ヒト肝癌移植マウスモデルの作製

ヒト肝癌細胞株 HuH-7 は、DMEM 培地と MATRIGEL (BD Bioscience 社製) を 1:1 で含む溶液にて 5×10^7 個/mL になるように調製した。前日に抗アジアロ GM1 抗体 (和光純薬社製、1 バイアルを 1 mL の注射用蒸留水で溶解
10 後 4 mL の生理的食塩水を添加) $100 \mu\text{L}$ を腹腔内へ投与した SCID マウス (オス、5 週齢) (日本クレア) の腹部皮下へ上記細胞懸濁液 $100 \mu\text{L}$ (5×10^6 個/マウス) を移植した。

20.2 抗体調製および投与

15 ヒト肝癌移植マウスモデルに対し、投与当日に PBS (−) で 0.5 mg/mL (5 mg/kg 投与群) および 0.1 mg/mL (1 mg/kg 投与群) になるように調製した抗体溶液を、細胞移植後 20 日目より、週に 1 回、3 週間、10 mL/kg にて、尾静脈より投与した。陰性対照として、PBS (−) (Vehicle) を同様に週に 1 回、
20 3 週間、10 mL/kg にて、尾静脈より投与した。いずれの群も、1 群 6 匹で行った。

20.3 抗腫瘍効果の評価

GC33 抗体のヒト肝癌移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果については腫瘍体積の経時変化および最終投与日より一週間後の腫瘍重量で評価した。腫瘍体積は
25 以下の式にて算出した。

腫瘍体積 = 長径 \times 短径 \times 短径 / 2 その結果、図 10 に示すとおり、GC33 抗体投与群では Vehicle 投与群と比較して有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。

以上より、GC33 抗体がヒト肝癌移植マウスモデルに対して、抗腫瘍効果を有することが示された。

実施例 2 1

GC33 マウスーヒトキメラ抗体の作製

- GC33 の H 鎖、L 鎖は、5' 末端側塩基配列に相補的でコザック配列、
- 5 HindIII 部位を有する合成オリゴヌクレオチド、および 3' 末端側塩基配列に相補的で BamHI 部位を有する合成オリゴヌクレオチドを用いて PCR により増幅した。得られた PCR 産物を HindIII、BamHI 消化後、ヒト IgG1 定常領域がクローニングされた発現ベクター-HEFg γ 1、およびヒト κ 鎖定常領域がクローニングされた発現ベクター-HEFg κ へクローニングした (Sato ら、Mol Immunol.
- 10 1994 ; 371-381)。上記方法に従い CHO 細胞 (DG44 株) へ導入し安定発現細胞株を樹立した。培養上清より Hi Trap ProteinG HP (Amersham 社) を用いて抗体を精製した。培養上清中の IgG 濃度の測定は、ヤギ抗ヒト IgG (BIOSOURCE 社) とヤギ抗ヒト IgG アルカリホスファターゼコンジュゲート (BIOSOURCE 社) を用いたヒト IgG サンドイッチ ELISA を行い、市販の精製
- 15 ヒト IgG (Cappel 社) との比較により定量した。

実施例 2 2

GC33 マウスーヒトキメラ抗体を用いた CDC 活性、ADCC 活性の測定

- 実施例 1 6 および 1 7 に記載した方法に従って GC33、M3C11、および
- 20 M1E7 マウスーヒトキメラ抗体の CDC 活性および ADCC 活性測定を行った。標的細胞として、CDC 活性は全長 GPC3 発現 CHO 細胞を、ADCC 活性は HepG2 をそれぞれ用いた。それぞれの結果を図 1 1、図 1 2 に示す。いずれの実験系においても GC33 は他 2 抗体と比較して強い CDC 活性および ADCC 活性を示すことが明らかとなった。

25

実施例 2 3

GC33 のエピトープ解析

GC33 についてはエピトープを詳細に決定するため、さらに短い GPC3C 末端ペプチドと GST の融合タンパク質を作製し、ウエスタンブロッティングにより

解析した。作製した GST 融合タンパク質に含まれる GPC3 由来ペプチド配列を図 1 3 に示す。GC33 は GC-4 (aa 537-563) に結合し、GC-5 (aa 550-563) に結合できないことから、エピトープが aa 537 - 550 の領域を少なくとも一部含む領域であると考えられた。始めに GC-6 (G N S Q Q A T P K D N E I S (配列番号 9 3))、GC-7 (G N S Q Q A T P (配列番号 9 4))、GC-8 (Q Q A T P K D N (配列番号 9 5))、GC-9 (T P K D N E I S (配列番号 9 6)) を作製した。5'端に EcoRI、3'端に SalI 認識配列の切断端が付加されるように設計したフォワードオリゴ DNA とリバースオリゴ DNA を作製した。オリゴ DNA はエスベックオリゴ株式会社に合成を委託し、C-18 カートリッジ精製され、5'末端リン酸化したものを使用した。10 μ M のフォワードオリゴ DNA 25 μ L と 10 μ M のリバースオリゴ DNA 25 μ L を混合し、94° C で 5 分間の後、37° C で 10 分間、室温で 15 分間反応させた後、4° C で 10 分放置し、フォワードオリゴ DNA とリバースオリゴ DNA をアニールさせた。吸光度測定により濃度を決定した後、インサート：ベクターのモル比が 3:1 となるように、EcoRI、SalI 消化した pGEX4T-3 にクローニングした。塩基配列を確認した後、上記方法に従い GST 融合タンパク質を調製し、Gluthatione Sepharose 4B を用いて精製した。これを還元条件下にて SDS-PAGE により分離し、GC33 を用いるウエスタンブロッティングにより解析した。いずれの GST 融合タンパク質も強くは検出できず、GC33 による結合はさらに C 末端側の配列が必要である事が予想された (図 1 4) 。そこで、GC-11 (A T P K D N E I S T (配列番号 9 7))、GC-12 (P K D N E I S T F H (配列番号 9 8))、GC-13 (D N E I S T F H N L (配列番号 9 9))、GC-14 (E I S T F H N L G N (配列番号 1 0 0)) を作製し同様に評価した結果、GC-11、GC-12、GC-13 が GC33 により強く結合された。この結果より、GC33 は GPC3 の C 末端 544 番目から 553 番目の配列 (P K D N E I S T F H) 内にそのエピトープが存在すると考えられる。

実施例 2 4

GC33 のヒト化

公開されている Kabat Database (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/kabat/>)、

および ImMunoGeneTics Database (IMGT)より抗体の配列データを入手し、H鎖可変領域、L鎖可変領域に分けてホモロジー検索を行った。その結果、H鎖可変領域は DN13(Smithson ら、Mol Immunol. 1999 ; 36 : 113-124)と高い相
同性を持つことが分かった。また、L鎖可変領域は Accession number
5 AB064105 の homo sapiens IGK mRNA for immunoglobulin kappa light chain
VLJ region, partial cds, clone:K64 と高い相同性を持つことが分かった。また、
L鎖のシグナル配列については AB064105 と相同性の高い Accession Number
S40357 のシグナル配列を利用した。これらのヒト抗体のフレームワーク領域(以
下、FR)に GC33 の相補性抗原決定領域 (以下、CDR) を移植して、ヒト化抗
10 体を作製した。

具体的には、50base 程度の合成オリゴ DNA を約 20base 程度ハイブリダイズ
するように設計し、これらの合成オリゴ DNA を PCR 法によりアッセンブリさ
せて各可変領域をコードする遺伝子を作製した。5' 端の合成オリゴ DNA の末
端に挿入した HindIII 部位、および 3' 端の合成オリゴ DNA の末端に挿入した
15 BamHI 部位で切断し、ヒト IgG1 定常領域がクローニングされた発現ベクター
HEFg γ 1、ヒト κ 鎖定常領域がクローニングされた発現ベクターHEFg κ へク
ローニングした (Sato ら、Mol Immunol. 1994 ; 371-381) 。このようにして
作製したヒト化 GC33 は H鎖、L鎖それぞれ ver.a と命名した。H鎖、L鎖と
もに ver.a のヒト化 GC33 (ver.a / ver.a) はマウス GC33 可変領域の抗体
20 (mouse / mouse) と比較して結合活性が低かった (図 15) 。H鎖と L鎖
についてマウス GC33 配列と ver.a 配列をキメラに組み合わせた抗体 (mouse /
ver.a、ver.a / mouse) を作製し結合活性を評価した結果、ver.a / mouse で結合
活性の低下が認められ、アミノ酸置換による結合活性の低下は H鎖に起因する
事が判明した。そこで、H鎖の改変体 ver.c、ver.f、ver.h、ver.i、ver.j、ver.k
25 を作製した。これらの全てのヒト化 GC33 はマウス GC33 可変領域を有するキ
メラ抗体と同等の結合活性を示した (図 15) 。ヒト化 GC33H鎖可変領域
ver.a、ver.c、ver.f、ver.h、ver.i、ver.j、ver.k の塩基配列を配列番号 77、7
8、79、80、81、82、83に、アミノ酸配列を配列番号 84、85、8
6、87、88、89、90に示す。ヒト化 GC33L鎖可変領域 ver.a の塩基配

列を配列番号 9 1 に、アミノ酸配列を配列番号 9 2 に示す。ヒト化 GC33H 鎖可変領域 ver.i、ver.j、ver.k では、6 番目のグルタミン酸がグルタミンに置換されているが、これらの抗体は熱安定性が顕著に増加していた。

5 実施例 2 5

ヒト化 GC33L 鎖の改変

蛋白質の脱アミド化については一次配列依存的な脱アミド化の反応速度定数が知られており、Asn-Gly が特に脱アミド化し易い配列として知られている (Rocinson ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2001 ; 98 ; 944-949.)。配列番号 10 9 1 に示されるヒト化 GC33L 鎖 ver.a 可変領域の CDR1 内にある Asn33 については、一次配列が Asn-Gly であることから、脱アミド化が容易に起きやすい配列である事が予想された。

Asn33 の脱アミド化による結合活性に対する影響を評価する為に、Asn33 を Asp に置換した改変抗体を作製した。点変異の導入には、Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene 社) を使用した。すなわち、125ng のセンスプライマー (CTT GTA CAC AGTGAC GGA AAC ACC TAT : 配列番号 1 7 2)、125ng のアンチセンスプライマー (ATA GGT GTT TCC GTC ACT GTG TAC AAG : 配列番号 1 7 3)、5 μ L の 10x reaction buffer、1 μ L の dNTP mix、10ng のヒト化 GC33L 鎖 ver.a がクローニングされた HEFg κ 、1 15 μ L の Pfu Turbo DNA Polymerase を含む 50uL の反応液を用い、95°C で 30 秒、55°C で 1 分、68°C で 9 分からなるサイクルを 12 回の PCR を行った。その後制限酵素 DpnI を加え 37°C で 2 時間消化したものをキットに添付の XL1-Blue コンピテント細胞に導入し形質転換体を得た。正しく変異の導入されたクローンについて、可変領域を切り出し、再度 HEFg κ へクローニングし直した。これを 20 μ L の Pfu Turbo DNA Polymerase を含む 50uL の反応液を用い、95°C で 30 秒、55°C で 1 分、68°C で 9 分からなるサイクルを 12 回の PCR を行った。その後制限酵素 DpnI を加え 37°C で 2 時間消化したものをキットに添付の XL1-Blue コンピテント細胞に導入し形質転換体を得た。正しく変異の導入されたクローンについて、可変領域を切り出し、再度 HEFg κ へクローニングし直した。これを 25 ヒト化 GC33H 鎖 ver.k がクローニングされた HEFg γ 1 と共に Fugene6 (Roche 社) を用いて COS 7 細胞へ導入し、一過性に発現させた抗体を培養上清から回収した。抗ヒト IgG 抗体を用いたサンドイッチ ELISA により抗体濃度を定量し、可溶型 GPC3 コア蛋白質を固相化したイムノプレートを用いた ELISA により改変抗体の結合活性を評価した。図 1 8 に示すように Asn33 を

Asp に置換した改変抗体 (N33D) では結合活性が消失しており、Asn33 で脱アミド化が起きた場合結合活性に与える影響は大きいと考えられた。

Asn33 の脱アミド化を抑制する方法として、Gly34 を他のアミノ酸に改変する方法が報告されている (WO03057881A1)。上記方法に従い、Quick
5 Change Site-Directed Mutagenesis Kit を用い、Gly34 を Cys、Met を除く他の 17 アミノ酸に置換して、一連の改変抗体 G34A、G34D、G34E、G34F、G34H、G34N、G34P、G34Q、G34I、G34K、G34L、G34V、G34W、G34Y、G34R、G34S、G34T を作製した。これを COS 7 細胞で一過性に発現させ、その培養上清を用いて結合活性の評価を行った。その結果、Pro (G34P)、Val
10 (G34V) 以外では G34 を他のアミノ酸に置換しても結合活性が維持されている事が判明した。

上述の改変抗体の軽鎖 CDR 1 のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 174 (G34A)、配列番号 175 (G34D)、配列番号 176 (G34E)、配列番号 177 (G34F)、配列番号 178 (G34H)、配列番号 179 (G34N)、
15 配列番号 180 (G34T)、配列番号 181 (G34Q)、配列番号 182 (G34I)、配列番号 183 (G34K)、配列番号 184 (G34L)、配列番号 185 (G34S)、配列番号 186 (G34W)、配列番号 187 (G34Y)、配列番号 188 (G34R)、配列番号 189 (G34V)、配列番号 190 (G34P) に記載する。また、上述の改変抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を、それぞれ
20 配列番号 191 (G34A)、配列番号 192 (G34D)、配列番号 193 (G34E)、配列番号 194 (G34F)、配列番号 195 (G34H)、配列番号 196 (G34N)、配列番号 197 (G34T)、配列番号 198 (G34Q)、配列番号 199 (G34I)、配列番号 200 (G34K)、配列番号 201 (G34L)、配列番号 202 (G34S)、配列番号 203 (G34W)、配列番号 204 (G34Y)、配列番号 205 (G34R)、配列番号 206 (G34V)、配列
25 番号 207 (G34P) に記載する。

実施例 26

全長ヒト GPC3 発現ヒト肝癌細胞株 (SK-03) の作製

抗 GPC3 抗体の生物活性評価用の細胞株を得るために、全長 GPC3 を発現するヒト肝癌細胞株の樹立を行った。

- 5 PvuI で処理した 1 μ g の全長ヒト GPC3 遺伝子発現ベクターを、2 μ L の FuGENE (Roche 社) と混合し、複合体を形成させた後に、SK-HEP-1 細胞 (ATCC より購入) に添加することにより、遺伝子導入を行った。CO₂ インキュベーターで 24 時間培養後、終濃度 1 mg/mL の Geneticin および 10% FBS を含むダルベッコ MEM (D-MEM, SIGMA 社) を用いて、GPC3 発現株を選抜した。得られた Geneticin 耐性コロニーを集め、限界希釈法により細胞のクローニングを行った。それぞれの細胞クローンのヒト GPC3 の発現はキメラ GC33 抗体と FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG 抗体(ICN 社)を用いたフローサイトメトリにより確認し、安定発現細胞株 SK-03 を取得した。
- 10

実施例 27

マウスーヒトキメラ抗体を用いた CDC 活性、ADCC 活性の比較

- 15 実施例 22 で示した GC33、M3C11、および M1E7 マウスーヒトキメラ抗体の CDC 活性および ADCC 活性を直接比較する目的で、3 抗体の ADCC、CDC 活性の測定を同一実験系で実施例 16 および 17 に記載した方法に従って行った。標的細胞として、CDC 活性は全長 GPC3 発現 CHO 細胞を、ADCC 活性は SK-03 をそれぞれ用いた。それぞれの結果を図 19、図 20 に示す。いずれの実験系においても GC33 は他 2 抗体と比較して強い CDC 活性および ADCC 活性を示すことが確認された。
- 20

産業上の利用性

- 本発明の抗体は、細胞増殖抑制剤として、抗癌剤として、および癌の診断薬として用いることができる。
- 25

請求の範囲

1. 以下の(1) - (12)のいずれか;

(1) 配列番号123に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
5 24に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号125に記載さ
れるアミノ酸配列を含むCDR3;

(2) 配列番号109に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
10に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号111に記載さ
れるアミノ酸配列を含むCDR3;

10 (3) 配列番号106に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
07に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号108に記載さ
れるアミノ酸配列を含むCDR3;

(4) 配列番号132に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
33に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号134に記載さ
15 れるアミノ酸配列を含むCDR3;

(5) 配列番号106に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
35に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号136に記載さ
れるアミノ酸配列を含むCDR3;

(6) 配列番号126に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
20 27に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号128に記載さ
れるアミノ酸配列を含むCDR3;

(7) 配列番号129に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
30に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号131に記載さ
れるアミノ酸配列を含むCDR3;

25 (8) 配列番号103に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
04に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号105に記載さ
れるアミノ酸配列を含むCDR3;

(9) 配列番号118に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 配列番号1
21に記載されるアミノ酸配列を含むCDR2, および配列番号122に記載さ

れるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(10) 配列番号115に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号116に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号117に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

5 (11) 配列番号112に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号113に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号114に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；または

(12) 配列番号118に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号119に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および120配列番号に記載
10 されるアミノ酸配列を含むCDR 3

のCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域を含む抗体。

2. 以下の(1)－(13)のいずれか：

(1) 配列番号143に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号158に記載さ
15 れるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(2) 配列番号143に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号145に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(3) 配列番号140に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号141に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号142に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；
20

(4) 配列番号167に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号168に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号169に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

25 (5) 配列番号170に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号171に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(6) 配列番号159に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号160に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号161に記載さ

れるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(7) 配列番号162に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号147に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号163に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

5 (8) 配列番号164に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号165に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号166に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(9) 配列番号137に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号138に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号139に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

10 (10) 配列番号155に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号156に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号157に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(11) 配列番号149に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号150に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号151に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(12) 配列番号146に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号147に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号148に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；または

20 (13) 配列番号152に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号153に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号154に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3

のCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

3. 以下の(1) - (13)：

25 (1) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号143，144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(2) それぞれ配列番号109，110および111に記載されるアミノ酸配

列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 4 3, 1 4 4 および 1 4 5 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

5 (3) それぞれ配列番号 1 0 6, 1 0 7 および 1 0 8 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 4 0, 1 4 1 および 1 4 2 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

10 (4) それぞれ配列番号 1 3 2, 1 3 3 および 1 3 4 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 6 7, 1 6 8 および 1 6 9 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

15 (5) それぞれ配列番号 1 0 6, 1 3 5 および 1 3 6 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 7 0, 1 4 4 および 1 7 1 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(6) それぞれ配列番号 1 2 6, 1 2 7 および 1 2 8 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 5 9, 1 6 0 および 1 6 1 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

20 (7) それぞれ配列番号 1 2 9, 1 3 0 および 1 3 1 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 6 2, 1 4 7 および 1 6 3 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

25 (8) それぞれ配列番号 1 2 9, 1 3 0 および 1 3 1 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 6 4, 1 6 5 および 1 6 6 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(9) それぞれ配列番号 1 0 3, 1 0 4 および 1 0 5 に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号

1 3 7, 1 3 8 および 1 3 9 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(10) それぞれ配列番号 1 1 8, 1 2 1 および 1 2 2 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 5 5, 1 5 6 および 1 5 7 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

(11) それぞれ配列番号 1 1 5, 1 1 6 および 1 1 7 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 4 9, 1 5 0 および 1 5 1 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域, を含む抗体;

(12) それぞれ配列番号 1 1 2, 1 1 3 および 1 1 4 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 4 6, 1 4 7 および 1 4 8 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体; および

(13) それぞれ配列番号 1 1 8, 1 1 9 および 1 2 0 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 5 2, 1 5 3 および 1 5 4 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含む抗体
からなる群より選択される抗体。

4. 以下の (1) ~ (7) のいずれかに記載の重鎖可変領域:

- (1) 配列番号 8 4 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
 - (2) 配列番号 8 5 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
 - (3) 配列番号 8 6 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
 - (4) 配列番号 8 7 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
 - (5) 配列番号 8 8 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
 - (6) 配列番号 8 9 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域; または
 - (7) 配列番号 9 0 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域;
- を有する抗体。

5. 配列番号 9 2 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を有する抗体。

6. 以下の(1)～(7)の抗体:

(1) 配列番号84に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;

5 (2) 配列番号85に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;

(3) 配列番号86に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;

(4) 配列番号87に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;

10 (5) 配列番号88に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;

(6) 配列番号89に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;および

15 (7) 配列番号90に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号92に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む抗体;

からなる群より選択される抗体。

7. 請求項1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入され、かつ請求項1～6のいずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体。

20 8. ヒト化抗体である請求項1～7のいずれかに記載の抗体。

9. グリピカン3に結合するヒト化抗体。

10. グリピカン3のアミノ酸残基524～563の配列からなるペプチドに結合する抗体。

25 11. グリピカン3のアミノ酸残基537～563の配列からなるペプチドに結合する抗体。

12. グリピカン3のアミノ酸残基550～563の配列からなるペプチドに結合しないことを特徴とする請求項10または11に記載の抗体。

13. グリピカン3のアミノ酸残基544～553の配列からなるペプチドに結合する抗体。

- 1 4. グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 4 6 ～ 5 5 1 の配列からなるペプチドに結合する抗体。
- 1 5. ヒト化抗体である請求項 9 - 1 4 のいずれかに記載の抗体。
- 1 6. 第 2 の抗体が結合しうるエピトープに結合することができる抗体であつて、前記第 2 の抗体は、それぞれ配列番号 1 2 3, 1 2 4 および 1 2 5 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号 1 4 3, 1 4 4 および 1 5 8 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 1, 2 および 3 を有する軽鎖可変領域を含むことを特徴とする抗体。
- 1 7. グリピカン 3 に結合し、グリピカン 3 を発現する細胞に対して高い C D C 活性を有する抗体。
- 1 8. グリピカン 3 に結合し、グリピカン 3 を発現する細胞に対して高い A D C C 活性を有する抗体。
- 1 9. 請求項 1 - 1 8 のいずれかに記載の抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド。
- 2 0. 配列番号 1 1 - 2 1, 3 3 - 4 3, 5 5 - 5 9, 6 5 - 7 0, 7 7 - 8 3 のいずれかに記載の塩基配列を有する、請求項 1 8 記載のポリヌクレオチド。
- 2 1. 請求項 1 - 1 8 のいずれかに記載の抗体を有効成分とする細胞増殖抑制剤。
- 2 2. 請求項 1 - 1 8 のいずれかに記載の抗体を有効成分とする抗癌剤。
- 2 3. 肝細胞癌を治療するための請求項 2 2 記載の抗癌剤。
- 2 4. グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 2 4 ～ 5 6 3 のアミノ酸配列からなるペプチド。
- 2 5. グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 3 7 ～ 5 6 3 のアミノ酸配列からなるペプチド。
- 2 6. グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 4 4 ～ 5 5 3 のアミノ酸配列からなるペプチド。
- 2 7. グリピカン 3 のアミノ酸残基 5 4 6 ～ 5 5 1 のアミノ酸配列からなるペプチド。
- 2 8. 以下の (1) - (1 5) のいずれか：

(1) 配列番号 174 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

5 (2) 配列番号 175 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(3) 配列番号 176 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

10 (4) 配列番号 177 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(5) 配列番号 178 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(6) 配列番号 179 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

20 (7) 配列番号 180 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(8) 配列番号 181 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

25 (9) 配列番号 182 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 3 ;

(10) 配列番号 183 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 1, 配列番号 144 に記載されるアミノ酸配列を含む CDR 2, および配列番号 158 に記載

されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(11) 配列番号184に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

5 (12) 配列番号185に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(13) 配列番号186に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号158に記載
10 されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

(14) 配列番号187に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；または

(15) 配列番号188に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，配列番号
15 144に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 2，および配列番号158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 3；

のCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体。

29. 以下の(1) - (15)：

(1) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配
20 列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号174，144および158，に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(2) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配
25 列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号175，144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(3) それぞれ配列番号123，124および125に記載されるアミノ酸配
列を含むCDR 1，2および3を有する重鎖可変領域，およびそれぞれ配列番号176，144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR 1，2およ

び3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(4) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号177, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2およ

5 び3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(5) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号178, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

10 (6) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号179, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(7) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号180, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(8) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号181, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(9) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号182, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(10) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号183, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体；

(11) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号184, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

- 5 (12) それぞれ配列番号123, 124, および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号185, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域, を含む抗体;

- 10 (13) それぞれ配列番号123, 124, および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号186, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体;

- 15 (14) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号187, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体; および

- 20 (15) それぞれ配列番号123, 124および125に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する重鎖可変領域, およびそれぞれ配列番号188, 144および158に記載されるアミノ酸配列を含むCDR1, 2および3を有する軽鎖可変領域を含む抗体,
からなる群より選択される抗体。

30. 以下の(1)～(15)からなる群より選択される軽鎖可変領域:

- (1) 配列番号191に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
(2) 配列番号192に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
25 (3) 配列番号193に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
(4) 配列番号194に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
(5) 配列番号195に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
(6) 配列番号196に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;
(7) 配列番号197に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域;

- (8) 配列番号 198 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (9) 配列番号 199 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (10) 配列番号 200 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (11) 配列番号 201 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- 5 (12) 配列番号 202 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (13) 配列番号 203 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- (14) 配列番号 204 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および
- (15) 配列番号 205 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；

を有する抗体。

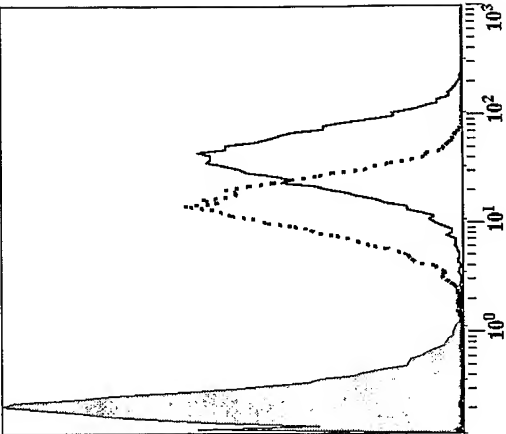
- 10 31. 以下の (1) ～ (15) からなる群より選択される軽鎖可変領域：
 - (1) 配列番号 191 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (2) 配列番号 192 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (3) 配列番号 193 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (4) 配列番号 194 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - 15 (5) 配列番号 195 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (6) 配列番号 196 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (7) 配列番号 197 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (8) 配列番号 198 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (9) 配列番号 199 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - 20 (10) 配列番号 200 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (11) 配列番号 201 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (12) 配列番号 202 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (13) 配列番号 203 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
 - (14) 配列番号 204 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；および
 - 25 (15) 配列番号 205 に記載のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；
- および、以下の (1) ～ (7) からなる群より選択される重鎖可変領域：
 - (1) 配列番号 84 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 - (2) 配列番号 85 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
 - (3) 配列番号 86 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

- (4) 配列番号 87 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (5) 配列番号 88 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
- (6) 配列番号 89 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および
- (7) 配列番号 90 に記載のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

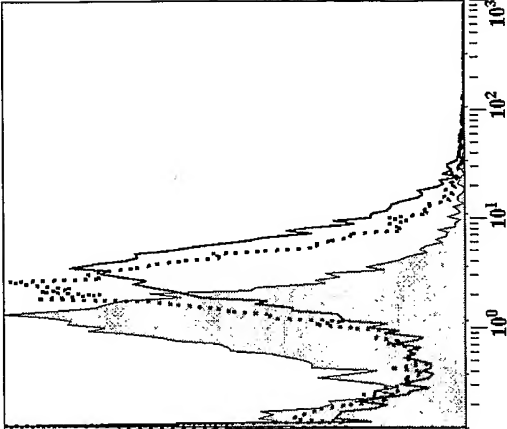
5 を有する抗体。

32. ヒト化抗体である請求項 28～31 のいずれかに記載の抗体。

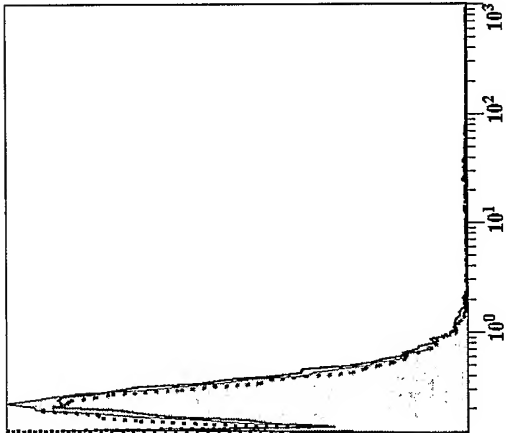
CHO/ヒトGPC3



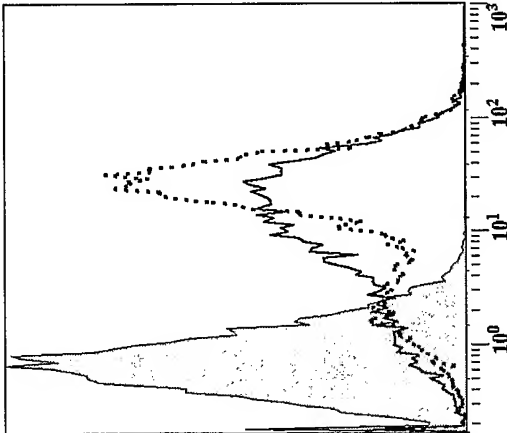
HuH-7



CHO



HepG2



2/20

Mab	示されるビオチン化 Mab の sGPC3 コアへの結合の阻害 (%)								エピトープ位置
	M3C11	M1E7	M11F1	M6B1	M18D4	M5B9	M10D2	L9G11	
M3C11	96.8	96.2	12.0	11.2	10.3	9.1	39.9	33.1	a
M13B3	71.3	95.7	15.6	9.3	2.7	-1.8	22.3	24.9	
M1E7	26.0	83.9	14.3	7.7	9.0	6.4	14.8	38.0	
M3B8	1.8	28.4	97.4	15.2	12.6	3.6	29.0	36.0	b
M11F1	2.0	3.9	81.8	5.6	-1.5	5.4	24.6	20.9	
M19B11	-4.1	-9.4	3.1	87.6	44.1	31.0	14.2	-9.8	c
M6B1	-5.7	-2.7	13.9	85.6	51.9	44.4	6.7	1.1	
M18D4	0.2	0.5	-0.3	38.6	89.0	89.4	19.1	6.7	
M5B9	0.1	2.7	5.3	23.2	77.3	77.3	13.4	10.3	
M10D2	-7.7	0.6	7.8	-5.9	-21.6	-10.3	79.2	7.2	d
L9G11	2.1	-4.8	6.0	10.1	15.7	6.4	1.2	92.2	e

図2

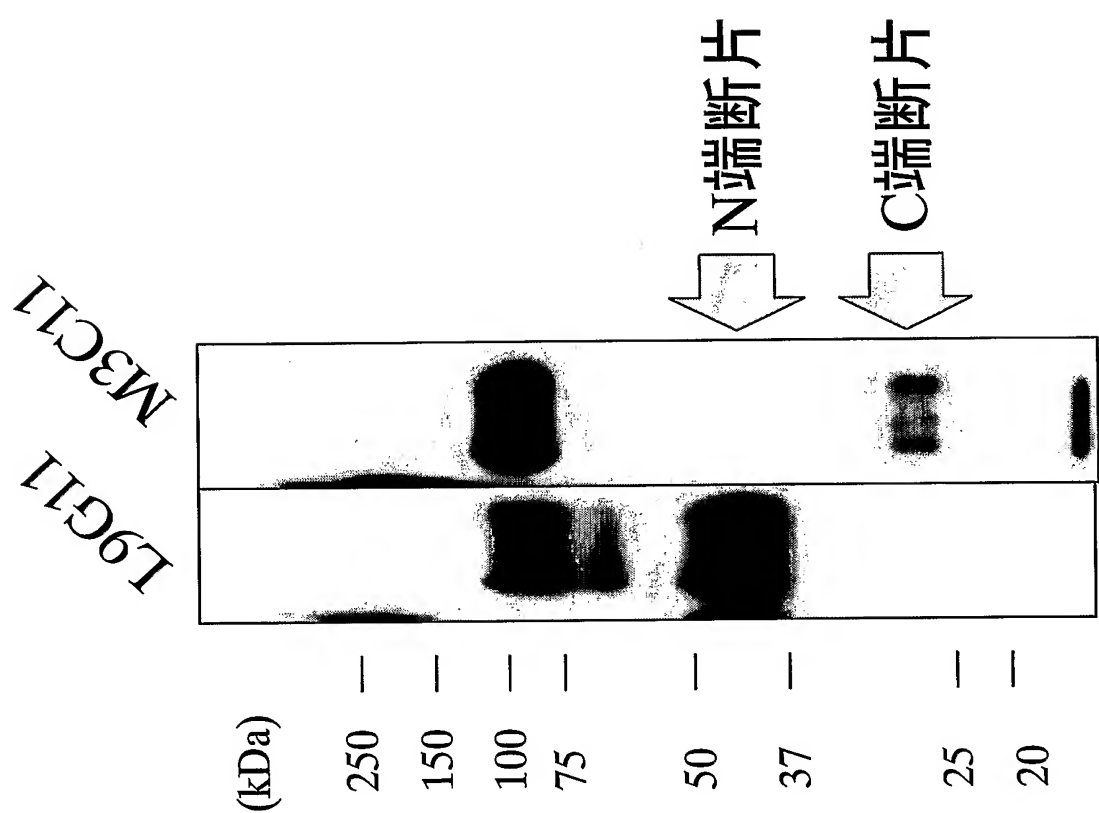


图3

4/20

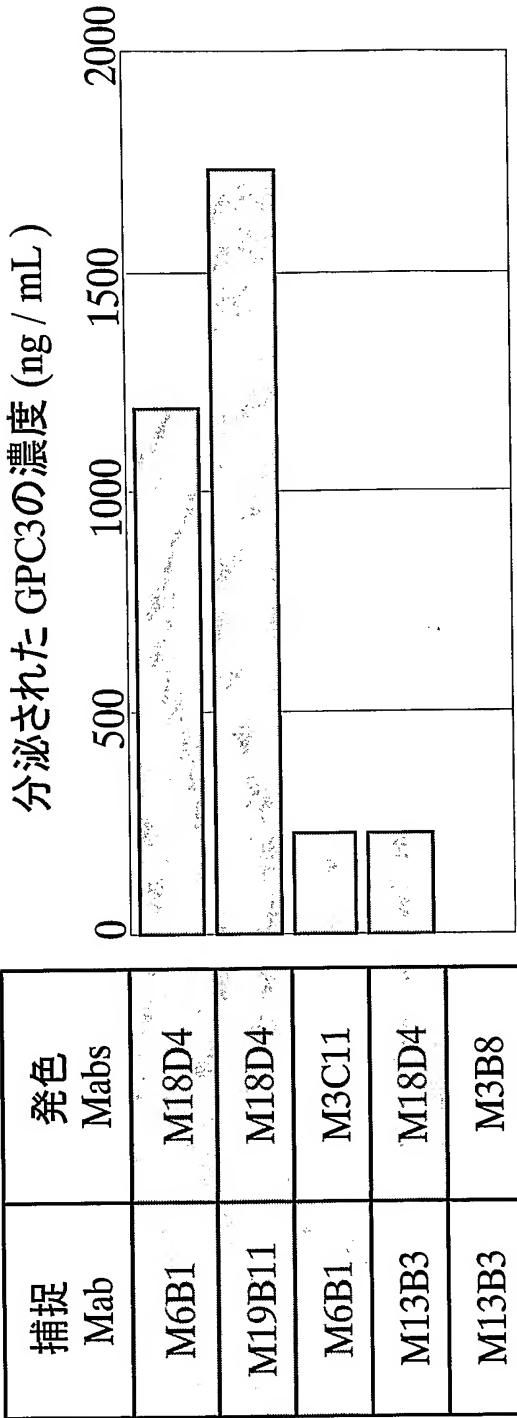


図4

5/20

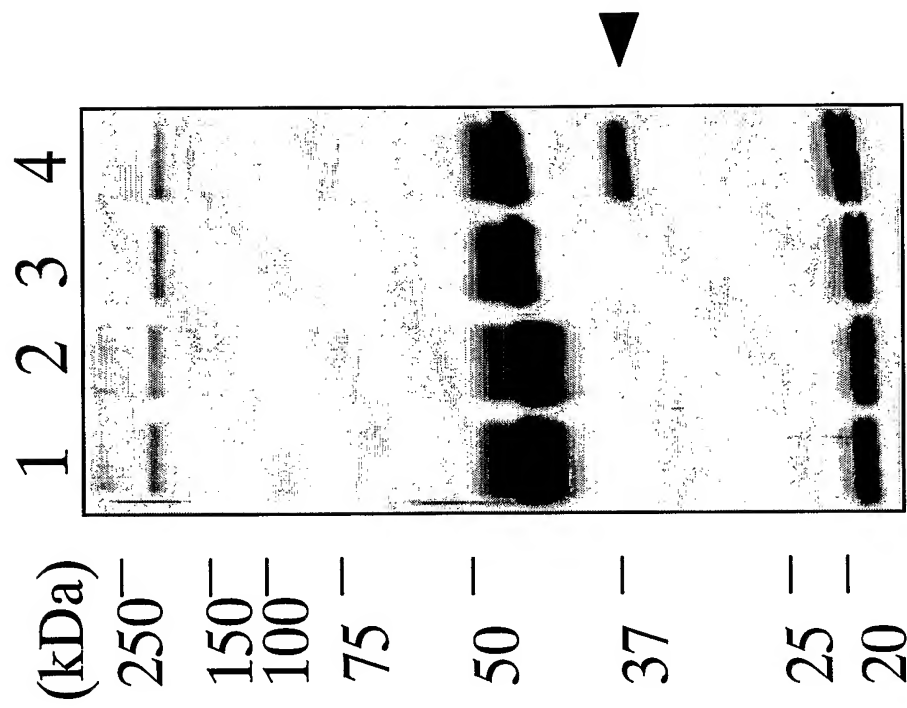
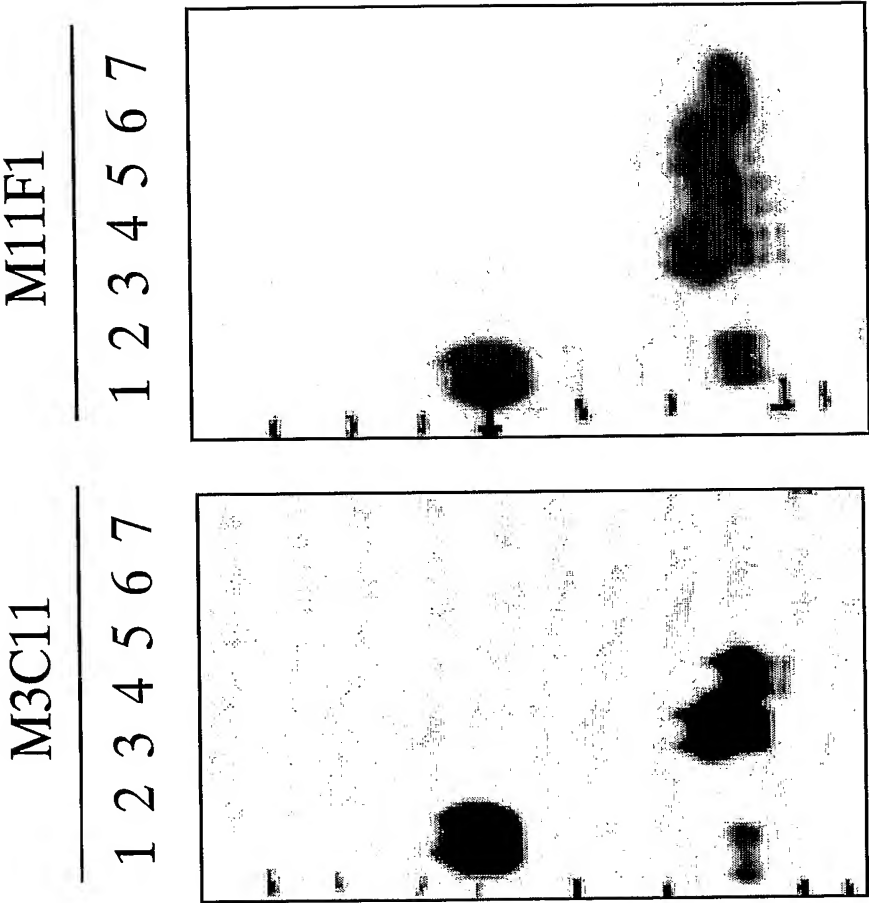


図5

6/20



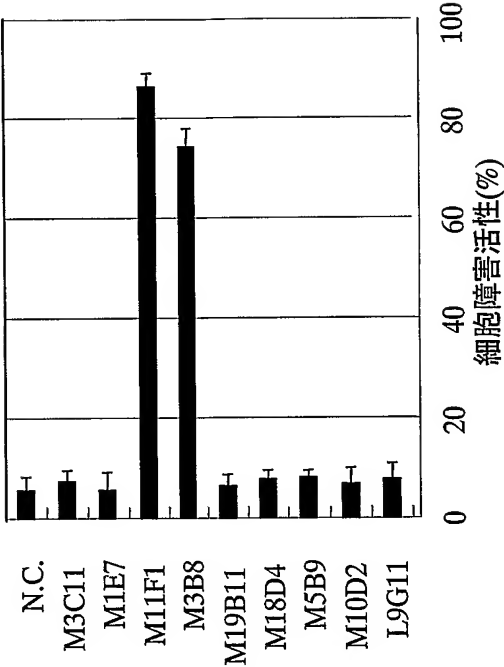


図7

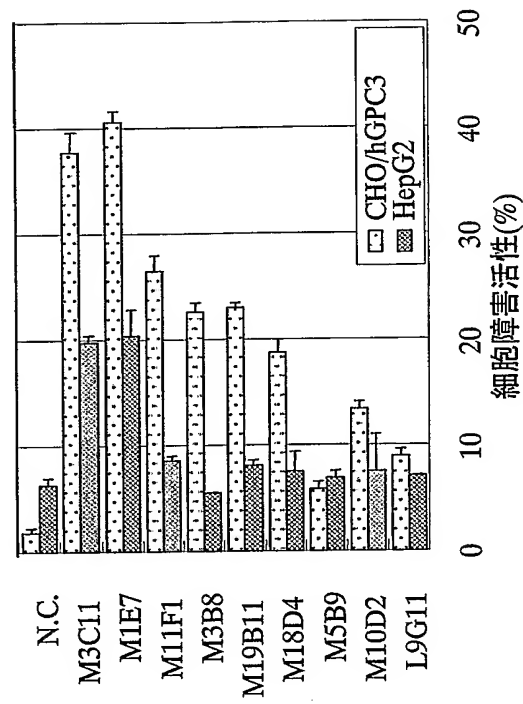


図8

9/20

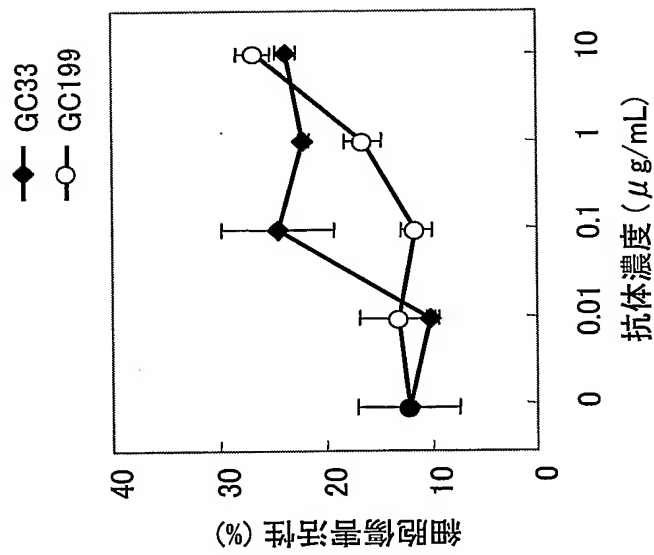


図9

10/20

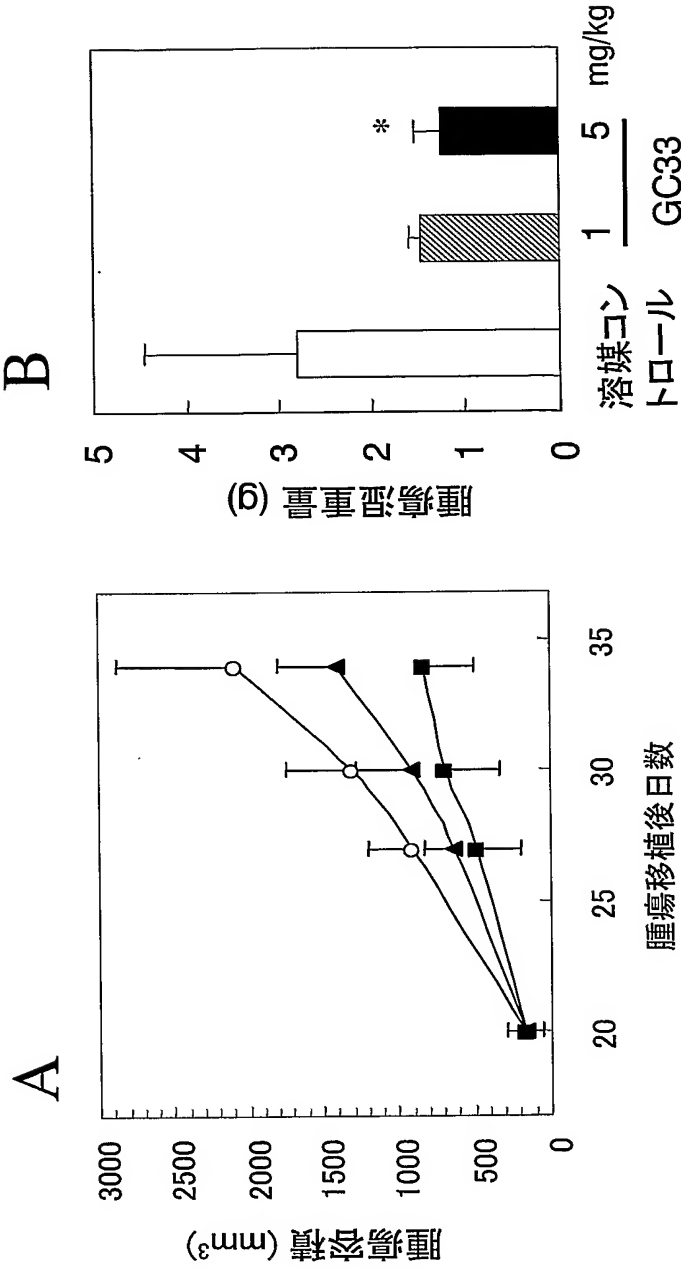


図10

11/20

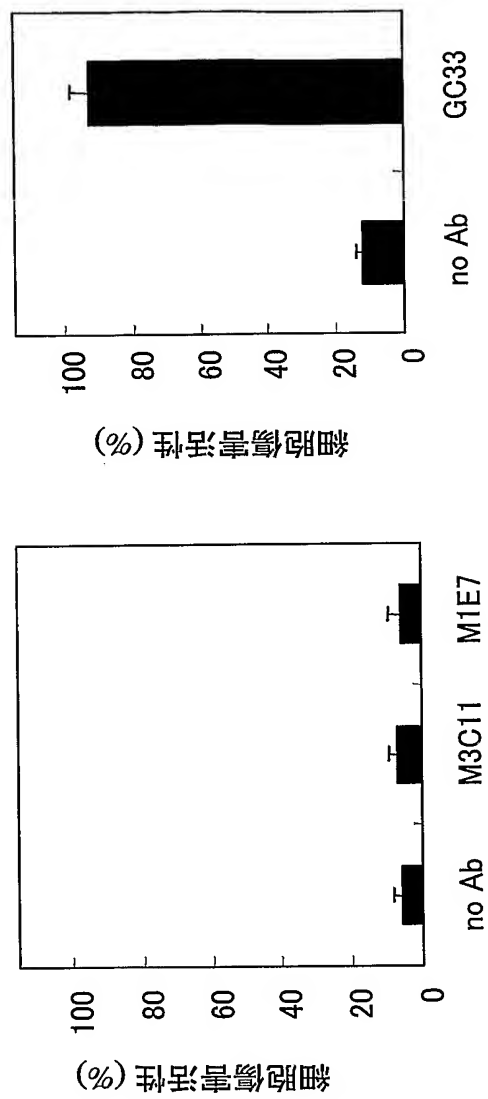


図11

12/20

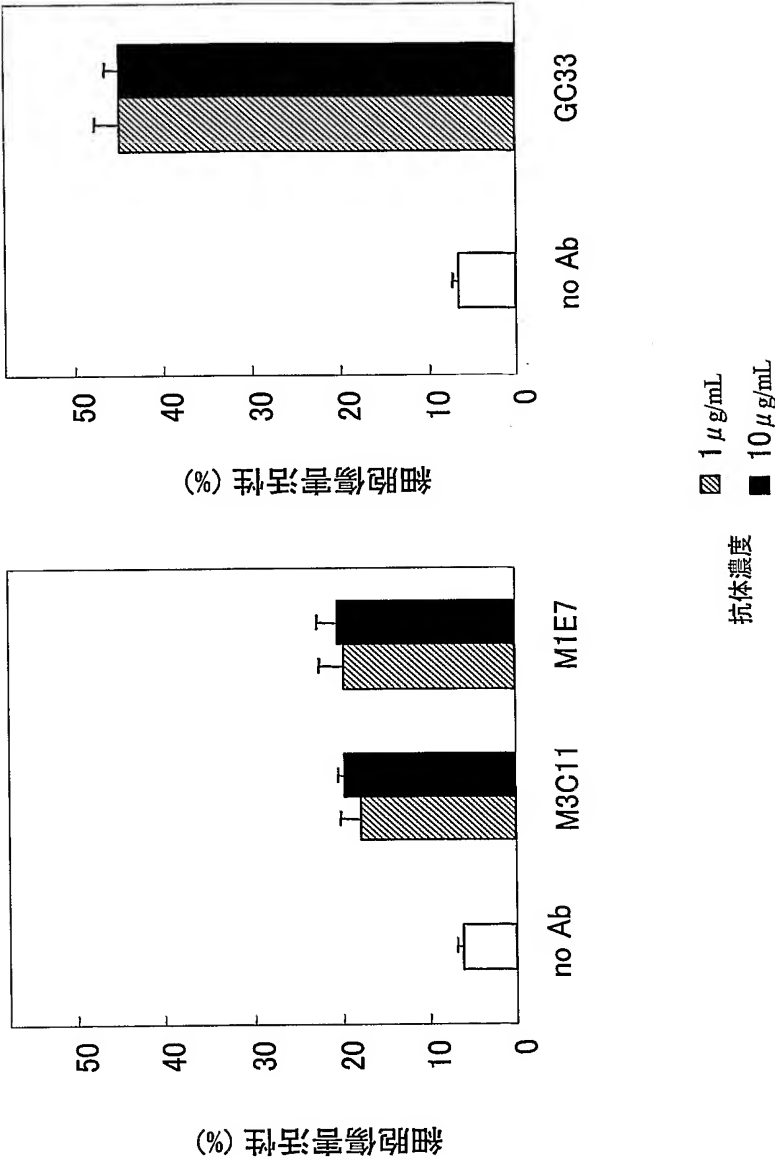


図12

GC-4	GNSQQATPKDNEISTFHNLGNVHSP	GC33
GC-5	STFHNLGNVHSP	WB
GC-6	GNSQQATPKDNEIS	O
GC-7	GNSQQATP	x
GC-8	QQAATPKDN	x
GC-9	TPKDNEIS	x
GC-11	ATPKDNEIST	x
GC-12	PKDNEISTFH	O
GC-13	DNEISTFHNL	O
GC-14	EISTFHNLGN	O
		x

14/20

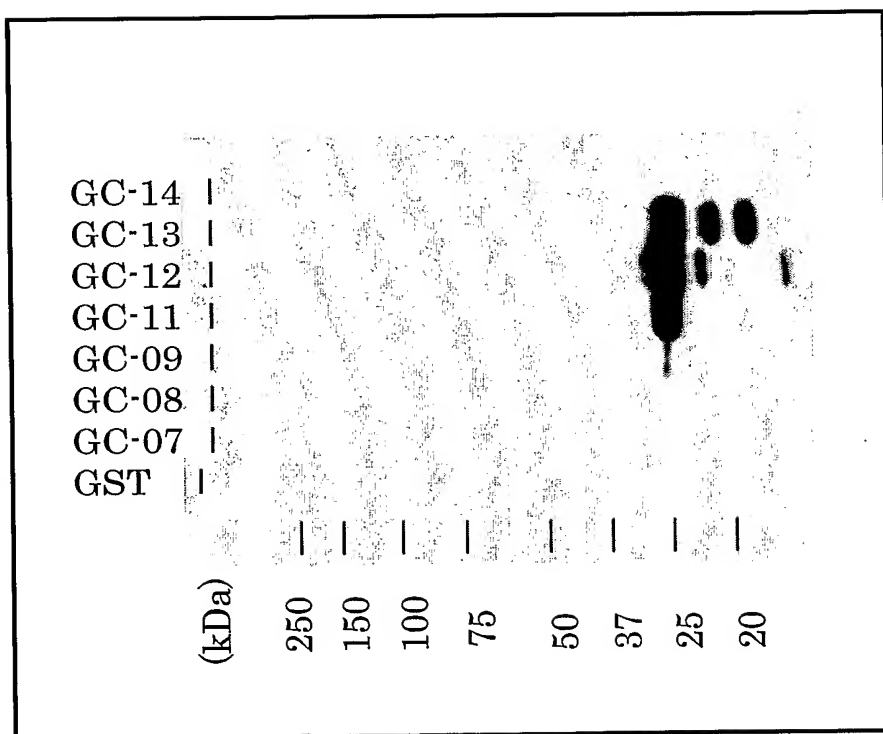


図14

15/20

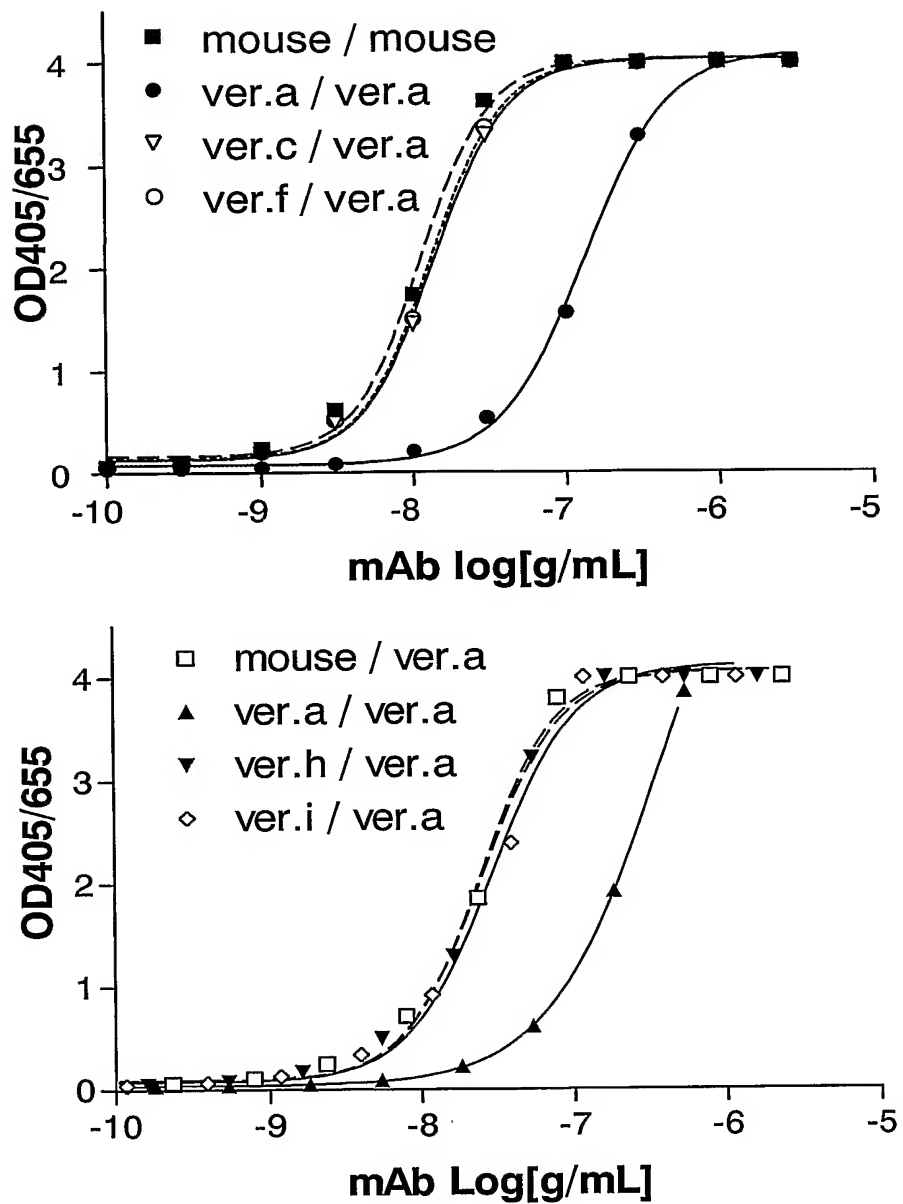


図15

16/20

クローン ID	アイソ タイプ	ELISA		BIACORE			エピトープ		FACS				免疫 沈殿
		EC50 (nM)	ka (1/Ms /10 ⁵)	ka (1/Ms /10 ⁵)	kd (1/s x10 ⁵)	KD (nM)	競合 ELISA	ウエスタン ブロットニング	CHO/ human GPC3	HepG2	HuH-7	CHO	
M3C11	IgG1	0.12	2.5	2.5	6.5	0.3	a	GC-2	83	59	9	-	△
M13B3	IgG1	0.25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.			N.D.	N.D.	-	N.D.	
M1E7	IgG1	0.96	1.5	42.7	2.8	28			16	5	-	x	
M3B8	IgG1	0.56	2.7	467.0	17.6	b	GC-4	12	6	3	-	x	
M11F1	IgG2b	2.17	1.4	3.5	0.2			9	4	2	-	x	
L9G11	IgG1	0.62	1.3	140.0	10.7	e	N	29	26	4	-	○	
M19B11	IgG1	0.18	1.5	17.1	1.1	c		39	44	3	-	○	
M6B1	IgG1	5.51	N.D.	N.D.	N.D.			37	34	3	-	○	
M18D4	IgG1	0.85	0.8	49.6	6.2			22	20	2	-	○	
M5B9	IgG1	1.13	0.6	139.0	23.5			25	23	2	-	○	
M10D2	IgG1	1.04	1.1	49.6	4.7			d	20	29	3	-	○

図16

17/20

クローン ID	アイソ タイプ	ELISA	エピトープ		FACS			
			競合 ELISA	ウエスタン ブロットインゲ	CHO/ ヒト GPC3	HepG2	HuH-7	CHO
GC199	IgG1	0.10	b	GC-4	15.5	12.2	2.4	-
GC202	IgG1	0.10			6.0	0.9	1.4	-
GC33	IgG2a	0.24			82.7	52.0	8.4	-
GC179	IgG2b	5.61	f	GC-3	7.1	6.5	3.8	-
GC194	IgG1	3.83			5.0	7.9	1.5	-

図17

18/20

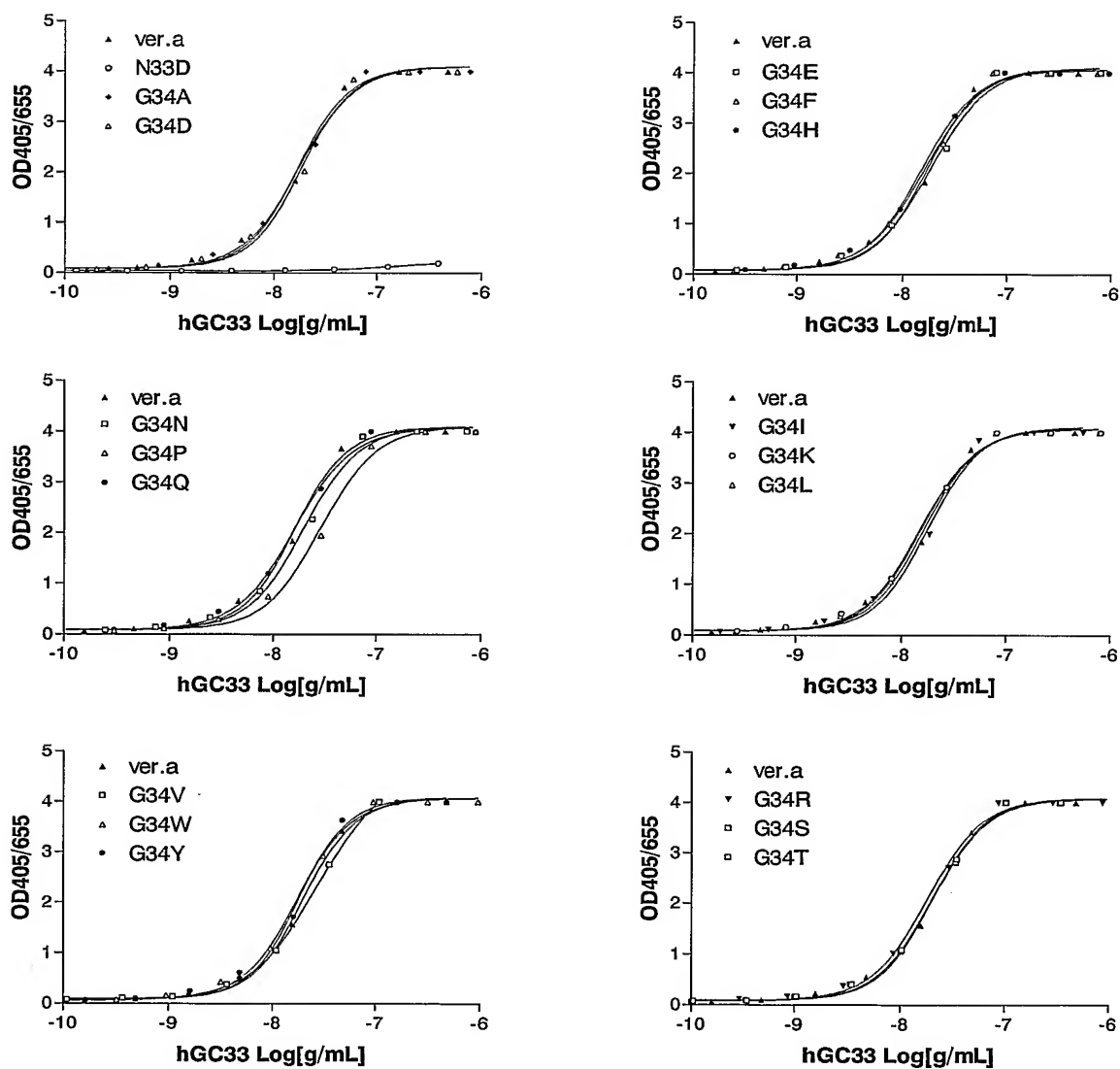


図18

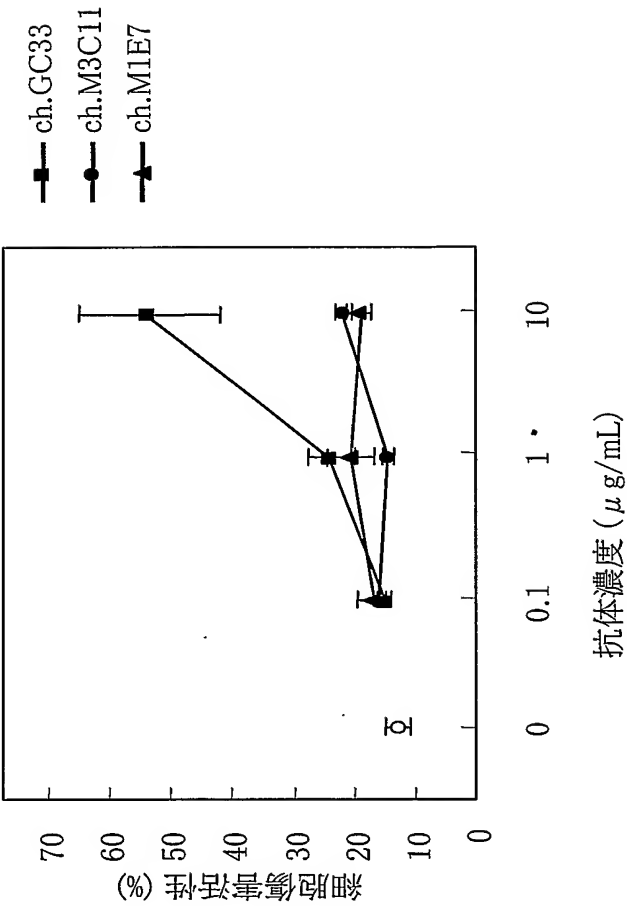


図19

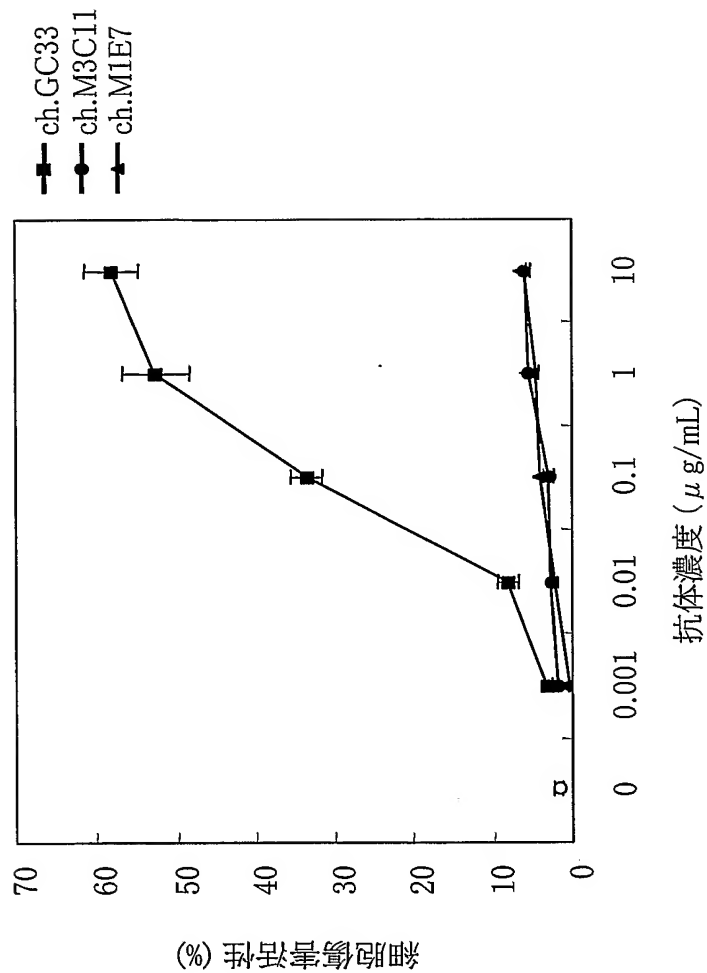


図20

SEQUENCE LISTING

<110> Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
 <120> Anti-Glypican 3 Antibodies
 <130> PCG-9009WO
 <150> JP 2004-203637
 <151> 2004-07-09
 <160> 173
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 1
 gatatcatgg ccgggaccgt gcgcaccgcg t 31
 <210> 2
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 2
 gctagctcag tgcaccagga agaagaagca c 31
 <210> 3
 <211> 1743
 <212> DNA
 <213> homo sapiens
 <400> 3
 atggccggga ccgtgcgcac cgcgtgcttg gtgggtggcga tgetgctcag cttggacttc 60
 ccgggacagg cgcagcccc gccgcgccg ccggacgcc aactgtcacca agtccgctcc 120
 ttcttccaga gactgcagcc cggactcaag tgggtgccag aaactcccgt gccaggatca 180
 gatttgcaag tatgtctccc taagggccca acatgctgct caagaaagat ggaagaaaaa 240
 taccaactaa cagcacgatt gaacatggaa cagctgcttc agtctgcaag tatggagctc 300
 aagttcttaa ttattcagaa tgctgcggtt ttccaagagg cctttgaaat tgttgcttcg 360
 catgccaaaga actacaccaa tgccatgttc aagaacaact acccaagcct gactccacaa 420
 gcttttgagt ttgtgggtga atttttcaca gatgtgtctc totacatctt gggttctgac 480
 atcaatgtag atgacatggc caatgaattg tttgacagcc tgtttccagt catctatacc 540
 cagctaataa acccaggcct gcctgattca gccttgagca tcaatgagtg cctccgagga 600
 gcaagacgtg acctgaaagt atttgggaat ttcccaagc ttattatgac ccagggttcc 660
 aagtcactgc aagtcactag gatcttcctt caggctctga atcttggaat tgaagtgatc 720
 aacacaactg atcacctgaa gttcagtaag gactgtggcc gaatgtcac cagaatgtgg 780

```

tactgtcttt actgccaggg actgatgatg gttaaaccct gtggcgggta ctgcaatgtg 840
gtcatgcaag gctgtatggc aggtgtgggtg gagattgaca agtactggag agaatacatt 900
ctgtcccttg aagaacttgt gaatggcatg tacagaatct atgacatgga gaacgtactg 960
cttggctctt tttcaacaat ccatgattct atccagtatg tccagaagaa tgcaggaaag 1020
ctgaccacca ctattggcaa gttatgtgcc cattctcaac aacgccaata tagatctgct 1080
tattatcctg aagatctctt tattgacaag aaagtattaa aagttgctca tgtagaacat 1140
gaagaaacct tatccagccg aagaagggaa ctaattcaga agttgaagtc tttcatcagc 1200
ttctatagtg ctttgctgg ctacatctgc agccatagcc ctgtggcgga aaacgacacc 1260
ctttgctgga atggacaaga actcgtggag agatacagcc aaaaggcagc aaggaatgga 1320
atgaaaaacc agttcaatct ccatgagctg aaaatgaagg gccctgagcc agtggtcagt 1380
caaattattg acaaactgaa gcacattaac cagctcctga gaaccatgtc tatgccccaa 1440
ggtagagttc tggataaaaa cctggatgag gaagggtttg aaagtggaga ctgcggtgat 1500
gatgaagatg agtgcattgg aggctctggt gatggaatga taaaagtga gaatcagctc 1560
cgcttccttg cagaactggc ctatgatctg gatgtggatg atgcgcctgg aaacagtcag 1620
caggcaactc cgaaggacaa cgagataagc acctttcaca acctcgggaa cgttcattcc 1680
ccgctgaagc ttctcaccag catggccatc togggtggtg gcttcttctt cctggtgcac 1740
tga

```

<210> 4

<211> 580

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 4

```

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
1           5           10           15
Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
20           25           30
Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
35           40           45
Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
50           55           60
Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
65           70           75           80
Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
85           90           95
Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
100          105          110
Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
115          120          125
Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
130          135          140
Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
145          150          155          160

```

Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
 165 170 175
 Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
 180 185 190
 Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
 195 200 205
 Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
 210 215 220
 Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
 225 230 235 240
 Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
 245 250 255
 Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
 260 265 270
 Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
 275 280 285
 Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
 290 295 300
 Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
 305 310 315 320
 Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
 325 330 335
 Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser
 340 345 350
 Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile
 355 360 365
 Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu
 370 375 380
 Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser
 385 390 395 400
 Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala
 405 410 415
 Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr
 420 425 430
 Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His
 435 440 445
 Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp
 450 455 460
 Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys
 465 470 475 480
 Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly
 485 490 495

Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly
500 505 510
Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr
515 520 525
Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
530 535 540
Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser
545 550 555 560
Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe
565 570 575
Phe Leu Val His
580

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 5

atagaattcc accatggccg ggaccgtgcg c

31

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 6

ataggatccc ttcagcgggg aatgaacgtt c

31

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 7

gggccagtgg atagacagat g

21

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 8
 cagggggccag tggatagacc gatg 24
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 9
 cagggggccag tggatagact gatg 24
 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer
 <400> 10
 gctcactgga tgggtgggaag atg 23
 <210> 11
 <211> 1392
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 11
 atgaacttcg ggctcacctt gatttttcott gtccttactt taaaagggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcaactgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gaggatccct gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ttccagtcgc tatgccatgt cttgggttcg ccagattcca 180
 gagaagatac tggagtgggt cgcagccatt gatagtagtg gtggtgacac ctactattta 240
 gacactgtga aggaccgatt caccatctcc agagacaatg ccaataatac cctgcacctg 300
 caaatgcgca gtctgaggtc tgaggacaca gccttgattt actgtgtaag acaggggggg 360
 gcttactggg gccaagggac tctgggtcact gtctctgcag ctagcaccaa gggcccatcg 420
 gtotttcccc tggcaccttc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 480
 ctgggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 540
 agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 600
 gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 660
 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 720
 acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtcct cctcttcccc 780
 ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtgggtggtg 840
 gacgtgagcc acgaagacct tgagggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
 cataatgcc aagacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtgggtcagc 960
 gtcttcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1020
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1080
 gaaccacagg tgtacacct gcccccattc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1140

ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1260
 ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtctttotca 1320
 tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
 ccgggtaaat ga 1392

<210> 12

<211> 342

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

gaggtgcacc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt aactatgccca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcagcc attaataata atggtgatga cacctactat 180
 ttagacactg tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acagccctgt attactgtgt aagacaaggg 300
 ggggcttact ggggccaaagg gactctgggc actgtctctg ca 342

<210> 13

<211> 1413

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

atgggatgga actggatctt tattttaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60
 gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tactacatgc actgggtgaa gcaaagtcct 180
 gaaaagagcc ttgagtggat tggagagatt aatcctagca ctggtggtac tacctacaac 240
 cagaagttca aggccaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaag gaggggcgga 360
 ttaactggga cgagcttctt tgettactgg ggccaagggga ctctgggtcac tgtctctgca 420
 gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtg 540
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 600
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 660
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720
 aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctggggggga 780
 ccgtcagctt tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 840
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtccctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1140
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gaggcagggtgg 1320
 caggcagggga acgtctttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413

<210> 14

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

caggtcactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttatggta tgggtgtagg ttggattcgt 120
 cagccttcag ggatgggtct ggagtggctg gccaacattt ggtggtatga tgctaagtac 180
 tataactctg acctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctcaa caaccagggtg 240
 ttctcaaga tctccagtgt ggacacttca gatactgcc aatactactg tgctcaaattg 300
 ggactggcct ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354

<210> 15

<211> 354

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

caggtcactc tgaaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg 60
 acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc atttatggta tgggtgtagg ttggattcgt 120
 cagccttcag ggaagggctct ggagtggctg gccaacattt ggtggaatga tgataagtac 180
 tataactcag cctgaagag ccggctcaca atctccaagg atacctcaa caaccaggta 240
 ttctcaaga tctccagtgt ggacactgca gatactgcc aatactactg tgctcaaata 300
 ggttacttct actttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca 354

<210> 16

<211> 1416

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

atgaacttcg ggctcacott gatcttcctc gtccttactt taaaagggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gagggaccct gaaactctcc 120
 tgtgcagcct ctggatccac ttctagtaac tatgccatgt cttgggttcg ccagactcca 180
 gagaagaggc tggagtgggt cgcagccatt gatagtaatg gaggtaccac ctactatcca 240
 gacactatga aggaccgatt caccatttcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
 caaatgaaca gtctgagggtc tgaagacaca gcctttttatc actgtacaag acataatgga 360
 gggatatgaaa actacggctg gtttgcttac tggggccaaag ggactctggt cactgtctct 420
 gcagctagca ccaagggccc atcggcttc cccctggcac cctcctcaa gagcacctct 480
 gggggcacag cggccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg 540
 tcgtggaact caggcgcctt gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggtg accgtgcctt ccagcagctt gggcaccacg 660
 acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 720

```

cccaaattctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 780
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggaac 840
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 900
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 960
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 1020
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 1080
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1140
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac 1200
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1260
gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1320
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 1380
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatga 1416

```

<210> 17

<211> 366

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 17

```

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggaggggc cctgaaactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcc tgtcttgggt tcgccagact 120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcagcc attaatagta atggaggtac cacctactat 180
ccagacacta tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaagac tcagccttgt attactgtac aagacataat 300
ggagggtatg aaaactacgg ctggtttgct tactggggcc aagggaactc ggtcactgtc 360
tctgca 366

```

<210> 18

<211> 1413

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 18

```

atggaatcta actggatact tccttttatt ctgtcggtag cttcaggggt ctactcagag 60
gttcagctcc agcagtctgg gactgtgctg gcaaggcctg gggcttcagt gaagatgtcc 120
tgcaaggcct ctggctacac ctttactggc tactggatgc gctgggtaaa acagaggcct 180
ggacagggtc tggaatggat tggcgctatt tatcctggaa atagtgatac aacatacaac 240
cagaagttca agggcaaggc caaactgact gcagtcacat ctgtcagcac tgcctacatg 300
gaactcagca gcctgacaaa tgaggactct gcggtctatt actgttcaag atcgggggac 360
ctaactgggg ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtct tacagccaaa 420
gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 480
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtc 540
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 600
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctoca gcagcttggg caccagacc 660
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 720
aatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 780

```

```

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 840
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 900
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 960
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 1020
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 1140
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 1200
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1260
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 1320
cagcagggga acgtottctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tga 1413

```

<210> 19

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 19

```

gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cacctttacc ggctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
cctggacagg gtctggaatg gattggcgct atttatcctg gaaatagtga tactaactac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catctgccag cactgcctac 240
atggagctca gcagcctgac aaatgaggac gctgcggtct atcactgtac aagatcgggg 300
gacctaaactg gggggcttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357

```

<210> 20

<211> 372

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 20

```

caggtccagc tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaaactg 60
tcctgcaagg cttctggata caccttact agctactgga tgcattgggt gaagcagagg 120
cctggacaag gccttgagtg gatcgagag attgatcctt ctgatagtta tacttactac 180
aatcaaaagt tcaggggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctocaa cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgttc aagatcaaatt 300
ctgggtgatg gtcactaccg gtttctgcg tttccttact ggggccaagg gactctggtc 360
actgtctctg ca 372

```

<210> 21

<211> 372

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 21

```

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaaac ctggggcttc agtgaagctg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga tgcactgggt gaaacagagg 120
cctggacaag gccttgaatg gattggtaca attgacctt ctgatagtga aactcactac 180

```

aatctacagt tcaaggacac ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attattgtat aagaggcgcc 300
 ttctatagtt cctatagtta ctgggcctgg tttgcttact ggggccaagg gactctggtc 360
 actgtctctg ca 372

<210> 22

<211> 463

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Met Asn Phe Gly Leu Thr Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Arg Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ile Pro Glu Lys Ile Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Ala Ile Asp Ser Ser Gly Gly Asp Thr Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80
 Asp Thr Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn
 85 90 95
 Thr Leu His Leu Gln Met Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Val Arg Gln Gly Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115 120 125
 Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 130 135 140
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 165 170 175
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 180 185 190
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 195 200 205
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 210 215 220
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 225 230 235 240
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

260 265 270
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 275 280 285
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 370 375 380
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460
 <210> 23
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 23
 Glu Val His Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Asn Asn Asn Gly Asp Asp Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Val Arg Gln Gly Gly Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

<210> 24

<211> 470

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Met Gly Trp Asn Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Lys Ser Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Ser Thr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Gly Leu Thr Gly Thr Ser Phe Phe Ala
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470
 <210> 25
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 25
 Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Met Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Tyr Asp Ala Lys Tyr Tyr Asn Ser Asp
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ser Ser Val Asp Thr Ser Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Gln Met Gly Leu Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ile Tyr
 20 25 30

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Asn Asn Gln Val
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ser Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Gln Ile Gly Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 27

<211> 471

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Met Asn Phe Gly Leu Thr Leu Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Gly Thr Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe
 35 40 45

Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Asp Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro
 65 70 75 80

Asp Thr Met Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Phe
 100 105 110
 Tyr His Cys Thr Arg His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe
 115 120 125
 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr
 130 135 140
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 165 170 175
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 180 185 190
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 195 200 205
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 210 215 220
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 260 265 270
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 290 295 300
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 325 330 335
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 340 345 350
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 355 360 365
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 370 375 380
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 385 390 395 400
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 420 425 430
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 435 440 445
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 450 455 460
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 29

<211> 470

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 29

Met Glu Ser Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Ala Ser Gly
 1 5 10 15
 Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Gly Tyr Trp Met Arg Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Thr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Val Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ser Arg Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr Ala Lys Ala Ser Thr Lys
 130 135 140
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 165 170 175
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 180 185 190
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 195 200 205
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 210 215 220
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 225 230 235 240
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 245 250 255
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 275 280 285
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 290 295 300
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 305 310 315 320
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 325 330 335
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 340 345 350
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 355 360 365
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 370 375 380
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 385 390 395 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 420 425 430
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 435 440 445
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 30

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ala Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Thr Arg Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 31

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Ser Asn Leu Gly Asp Gly His Tyr Arg Phe Pro Ala Phe Pro
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 32

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Leu Gln Phe
 50 55 60
 Lys Asp Thr Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ile Arg Gly Ala Phe Tyr Ser Ser Tyr Ser Tyr Trp Ala Trp Phe Ala
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 33

<211> 717

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 33

atgagtctctg cccagttcct gtttctgtta gtgctctgga ttcgggaaac caacggtgat 60
 gttgtgatga cccagactcc actcactttg tcggttacca ttggacaacc agcctccatc 120
 tcttgcaagt caagtcagag cctcttagat agtgatggaa agacatattt gaattgggtg 180
 ttacagaggc caggccagtc tccaaagcgc ctaatctatc tgggtgtctaa attggactot 240
 ggagcccctg acaggttcac tggcagtggga tcagggacag atttcacact gaaaatcagt 300
 agagtggagg ctgaggattt gggaatttat tattgctggc aaggtacaca ttttcgcgtc 360

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
 aataactttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttga 717

<210> 34

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 34

gatgttgtga tgaccagtc tccactcaact ttgtcgatta ccattggaca accagcctcc 60
 atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
 ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactct atctggtgtc taaactggac 180
 tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcagga cagatttctc actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggaatt tattattgct ggcaaggtag acattttcgg 300
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 35

<211> 717

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 35

atgagtcctg tccagttcct gtttctgtta atgctctgga ttcaggaaac caacggtgat 60
 gttgtgatga cccagactcc actgtctttg tcggttacca ttggacaacc agcctctatc 120
 tcttgcaagt caagtcagag cctcttatat agtaatggaa agacatattt gaattgggta 180
 caacagaggc ctggccaggc tccaaagcac ctaatgtatc aggtgtccaa actggaccct 240
 ggcatccctg acaggttcag tggcagtgga tcagaaacag attttacact taaaatcagc 300
 agagtggagg ctgaagattt gggagtttat tactgcttgc aaagtacata ttatccgctc 360
 acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420
 atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
 aataactttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540
 ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600
 agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660
 acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgttga 717

<210> 36

<211> 324

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 36

gacatcaaga tgaccagtc tccatcttcc atgtatgcac ctctaggaga gagagtcact 60
 atcacttgca aggcgagtca ggacattaat aactatttaa gctgggtcca gcagaaacca 120
 gggaaatctc ctaagaccct gatctatcgt gcaaacagat tggtagatgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtat 240
 gaagatatgg gaattaatta ttgtctacag tgtgatgagt ttccctccgtg gacgttcggt 300
 ggaggcacca agctggaaat caaa 324

<210> 37

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 37

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttccg 300
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 38

<211> 705

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 38

atgagaccct ccattcagtt cctggggctc ttgttgttct ggcttcatgg tgttcagtgt 60
 gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 120
 atcacttgca aggcaagtca ggacattaac aagaatatag tttggtacca acacaagcct 180
 ggaaaaggtc ctaggctgct catatggtac acatctacat tacagccagg catcccatca 240
 aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 300
 gaagatattg caacttatta ctgtctacag tatgataatc ttccacggac gttcgggtgga 360
 ggcaccaaac tggaaatcaa acgtacgggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcga 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttga 705

<210> 39

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 39

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60
 atcacttgca aggcaagtca ggacattaac aagaatataa tttggtacca acacaagcct 120
 ggaaaaggtc ctaggctgct catatggtac acatctacat tacagccagg catcccatca 180
 aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 240
 gaagatattg caacttatta ctgtctacag tatgataatc ttccacggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 40

<211> 720

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 40

```

atgaggttct ctgctcagct tctggggctg cttgtgctct ggatccctgg atccactgca    60
gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaac atcaacttcc    120
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg    180
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc    240
tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc    300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg    360
tatacgttcg gatcggggac caagctggaa ataaaacgta cggtggctgc accatctgtc    420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg    480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa    540
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc    600
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgccctgcgaa    660
gtcaccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga    720

```

<210> 41

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 41

```

gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc    60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatcactta tttgtattgg    120
tttctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgcc    180
tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc    240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg    300
tatacgttcg gatcggggac caagctggaa ataaaa                               336

```

<210> 42

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 42

```

gatattgtgc taactcagtc tccagccacc ctgtctgtga ctccaggaga cagagtcagt    60
ctttcctgca gggccagcca tagtattagc aacttcctac actggtatcc acaaaaatca    120
catgagtctc caaggcttct catcaagtat gcttcccagt ccatctctgg gatcccctcc    180
aggttcagtg gcaatggatc agggacagat ttactctca gtatcaacag tgtggagact    240
gaagattttg gaatgtattt ctgtcaacag agtaacatct ggtogetcac gttcggtgct    300
gggaccaagc tggagctgaa a                                           321

```

<210> 43

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 43

```

gacattgtgc tcaccaatc tccaacttct ttggctgtgt ctctagggca gagtgtcacc      60
atctcctgca gagccagtga aagtgttgaa tattatggca ctagtttaat gcagtggtag      120
caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatttatg gtgcatccaa cgtagaatct      180
gggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat      240
cctgtggagg aggatgatat tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggaa ggttccgtat      300
acgttcggat cggggaccaa gctggaaata aaa                                     333

```

<210> 44

<211> 238

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 44

```

Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg Glu
1           5           10           15
Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val
          20          25          30
Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
          35          40          45
Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro
          50          55          60
Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
          65          70          75          80
Gly Ala Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
          85          90          95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
          100         105         110
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
          115         120         125
Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
          130         135         140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
          145         150         155         160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
          165         170         175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
          180         185         190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
          195         200         205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
          210         215         220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

```

225 230 235
 <210> 45
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 45
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Thr Leu Ser Ile Thr Ile Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 <210> 46
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 46
 Met Ser Pro Val Gln Phe Leu Phe Leu Leu Met Leu Trp Ile Gln Glu
 1 5 10 15
 Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val
 20 25 30
 Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45
 Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ala Pro Lys His Leu Met Tyr Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
 65 70 75 80
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Glu Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Leu Gln Ser Thr Tyr Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 47

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 47

Asp Ile Lys Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Tyr Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asp Met Gly Ile Asn Tyr Cys Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Pro
 85 90 95
 Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 49
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 49
 Met Arg Pro Ser Ile Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Phe Trp Leu His
 1 5 10 15
 Gly Val Gln Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Leu Gly Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
 35 40 45
 Ile Asn Lys Asn Ile Val Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Trp Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser
 85 90 95
 Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp
 100 105 110
 Asn Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 50

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Asn

20 25 30

Ile Ile Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Trp Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 51

<211> 239

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 51

Met Arg Phe Ser Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Ala Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro

20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser

35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys

50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala

65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe

85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr

100 105 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys

115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 52

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 53

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 53

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser His Ser Ile Ser Asn Phe
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Pro Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Asn Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Thr
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ile Trp Ser Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
 20 25 30
 Gly Thr Ser Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
 85 90 95
 Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 55

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 55

cagatccagt tggagcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
 tcctgcaagg cttctgggta tattttcaga gactattcaa tgcactgggt gaagcaggct 120
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacactg agacgggtga gccaacatat 180
 gcagatgact tcaagggacg gtttgccctc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
 ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtac tagcctttac 300
 tggggccaag ggactctggt cactgtctct gca 333

<210> 56

<211> 372

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 56

```

cagggtcactc tgaagagtc tggccctggg atattgcagc cctcccagac cctcagtctg      60
acttgttctt tctctgggtt ttcactgagc acttatggta tgggtgtagg ttggattcgt      120
cagccttcag ggaagggctt ggagtggctg gccaacattt ggtggcatga tgataagtac      180
tataactcag ccctgaagag cgggctcaca atctccaagg atatctccaa caaccaggta      240
ttcctcaaga tctccagtgt ggacactgca gatactgcc aatactactg tgctcaaata      300
gccctcgat ataataagta cgaaggcttt tttgctttct ggggccaagg gactctggtc      360
actgtctctg ca                                     372

```

<210> 57

<211> 345

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 57

```

caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg      60
tcctgcaagg ctctgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca      120
cctgtgcatg gcctaaaatg gattggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac      180
agtcagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac      240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagattctac      300
tcctatactt actggggcca agggactctg gtcactgtct ctgca                               345

```

<210> 58

<211> 357

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 58

```

gaggtgcagc ttgttgagac tgggtggagga ctggtgcagc ctgaagggtc attgaaactc      60
tcatgtgcag cttctggatt cagcttcaat atcaatgcc aagaactgggt ccgccaggct      120
ccaggaaagg gtttggaatg ggttgctcgc ataagaagt aaagtaataa ttatgcaaca      180
tattatggcg attcagtga agacagggtc accatctcca gagatgattc aaaaacatg      240
ctctatctac aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatatatta ctgtgtgaga      300
gaggtaacta catcgtttgc ttattggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca          357

```

<210> 59

<211> 369

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 59

```

gaggtgcagc ttgttgagac tgggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc      60
tcatgtgcag cctctggatt caccttcaat gccagtgcc aagaactgggt ccgccaggct      120
ccaggaaagg gtttggaatg ggttgctcgc ataagaagta aaagtaataa ttatgcaata      180
tattatgccg attcagtga agacagggtc accatctcca gagatgattc aaaaagcatg      240
ctctatctgc aaatgaacaa cttgaaaact gaggacacag ccatgtatta ctgtgtgaga      300

```

gatccgggct actatggttaa cccctgggtt gcttactggg gccaaaggac tctggtoact 360
gtctctgca 369

<210> 60

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 60

Gln Ile Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Arg Asp Tyr
20 25 30
Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
Thr Ser Leu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
100 105 110

<210> 61

<211> 124

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 61

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ile Ser Asn Asn Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Ile Ser Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Gln Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala
100 105 110
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 62

<211> 115

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 62

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Lys Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala

115

<210> 63

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 63

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ile Asn
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 64

<211> 123

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 64

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ala Ser
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Val Arg Asp Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Trp Phe Ala Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115 120

<210> 65

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 65

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcggta cccttggaca accagcctcc 60
 atctcttgca agtcaagtca gagcctotta catagtgatg gaaagacatt tttgaattgg 120
 ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactct atctgggtgtc tagactggac 180
 tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct gccaaaggtag acattttcct 300
 cggacgttcg gtggaggcac caggctggaa atcaaa 336

<210> 66

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 66

gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagaattgg 120
 tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttccg 300

tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa

336

<210> 67

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 67

gatgttgatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
atctcttgca gatctagatga gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaaatac acatgttcct 300
cctacgttcg gatcggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 68

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 68

gatattgtga tgactcagtc tgcaccctct gtacctgtca ctctgggaga gtcagtatcc 60
atctcctgca agtctagtaa gagtctctg catagtaatg gcaacactta cttgaattgg 120
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcaa ctctgattt attggatgta caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 240
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgta tgcaacatat agaataccct 300
ttcacgttcg gcacggggac aaaattggaa ataaaa 336

<210> 69

<211> 336

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 69

gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaa atcagcttcc 60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagttagt acatcaactta tttgtattgg 120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctctgattt atcagatgta caaccttgcc 180
tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgtg ctcaaaatct agaacttcct 300
ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 336

<210> 70

<211> 318

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 70

caaattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtotgcat ttccagggga gaaggtcacc 60
atgacctgca gtgccagctc aagtgttagt tacatgtact ggtaccagca gaagtcagga 120
tcctccccc gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctottac tctctcaciaa tcagccgaat ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgagg agtagttacc cgcacacgtt cgggtgggtggg 300
 accgagctgg agctgaaa 318

<210> 71

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Cys Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 72

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 72

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Ile Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 75

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Phe Ser Asn Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Tyr Asp Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn
 85 90 95
 Leu Glu Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Phe Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 77

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 77

caggtgcagc tgggtggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctgggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt ggcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagattctac 300
 tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 78

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 78

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
 tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 79

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 79

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
 tcctatactt actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct cctca 345

<210> 80

<211> 345

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 80

caggtgcagc tggaggagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactggtga tactgcctac 180
 agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300

tctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345
<210> 81
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Mouse-human chimeric antibody H chain
<400> 81
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345
<210> 82
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Mouse-human chimeric antibody H chain
<400> 82
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345
<210> 83
<211> 345
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Mouse-human chimeric antibody H chain
<400> 83
caggtgcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc gactatgaaa tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggagct cttgatccta aaactgggtga tactgcctac 180
agtcagaagt tcaagggcag agtcacgctg accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgac atctgaggac acggccgtgt attactgtac aagattctac 300
tcctatactt actggggcca gggaaccctg gtcaccgtct cctca 345
<210> 84
<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 84

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 85

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 85

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 86

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 86

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 87

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 87

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 88

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 88

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 89

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 89

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser

115

<210> 90

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody H chain

<400> 90

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Glu Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser

115

<210> 91

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody L chain

<400> 91

gatgttgtga tgactcagtc tccactctcc ctgcccgtca cccctggaga gccggcctcc 60
 atctcctgca gatctagtca gaggcttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120

tacctgcaga agccagggca gtctccacag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt 180
 tctgggggtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgct ctcaaaatac acatgttctc 300
 cctacgtttg gccaggggac caagctggag atcaaa 336

<210> 92

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mouse-human chimeric antibody L chain

<400> 92

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 93

<211> 14

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 93

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser
 1 5 10

<210> 94

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 94

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro
 1 5

<210> 95

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 95

Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn

1 5

<210> 96

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 96

Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser

1 5

<210> 97

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 97

Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr

1 5 10

<210> 98

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 98

Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His

1 5 10

<210> 99

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 99

Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu

1 5 10

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 100

Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn

1 5 10

<210> 101

<211> 27

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 101

Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe

1 5 10 15

His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys

20 25

<210> 102

<211> 14

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 102

Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys

1 5 10

<210> 103

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 103

Asn Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 104

Ala Ile Asn Asn Asn Gly Asp Asp Thr Tyr Tyr Leu Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 105

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 105

Gln Gly Gly Ala Tyr

1 5

<210> 106

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 106

Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly

1 5
<210> 107
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 107
Asn Ile Trp Trp Tyr Asp Ala Lys Tyr Tyr Asn Ser Asp Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 108
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 108
Met Gly Leu Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5
<210> 109
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 109
Ile Tyr Gly Met Gly Val Gly
1 5
<210> 110
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 110
Asn Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 111
<211> 8
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 111
Ile Gly Tyr Phe Tyr Phe Asp Tyr
1 5
<210> 112
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 112
Gly Tyr Trp Met His

1 5
<210> 113
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 113
Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 114
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 114
Ser Gly Asp Leu Thr Gly Gly Leu Ala Tyr
1 5 10

<210> 115
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 115
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 116
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 116
Ala Ile Asn Ser Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 117
<211> 13
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 117
His Asn Gly Gly Tyr Glu Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 118
<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 118

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 119

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 119

Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asn Gln Lys Phe Arg

1 5 10 15

Gly

<210> 120

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 120

Ser Asn Leu Gly Asp Gly His Tyr Arg Phe Pro Ala Phe Pro Tyr

1 5 10 15

<210> 121

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 121

Thr Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Leu Gln Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 122

Gly Ala Phe Tyr Ser Ser Tyr Ser Tyr Trp Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10 15

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 123

Asp Tyr Glu Met His

1 5

<210> 124

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 124

Ala Leu Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 125

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 125

Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr

1 5

<210> 126

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 126

Ile Asn Ala Met Asn

1 5

<210> 127

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 127

Arg Ile Arg Ser Glu Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 128

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 128

Glu Val Thr Thr Ser Phe Ala Tyr

1 5

<210> 129

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 129

Ala Ser Ala Met Asn

1 5

<210> 130

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 130

Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Asp

<210> 131

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 131

Asp Pro Gly Tyr Tyr Gly Asn Pro Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 132

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 132

Asp Tyr Ser Met His

1 5

<210> 133

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 133

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 134

<211> 2

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 134

Leu Tyr

1

<210> 135

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 135

Asn Ile Trp Trp His Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 136

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 136

Ile Ala Pro Arg Tyr Asn Lys Tyr Glu Gly Phe Phe Ala Phe

1 5 10

<210> 137

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 137

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 138

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 138

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 139

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 139

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 140

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Ser

1 5 10

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 141

Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp

1 5

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 142

Leu Gln Cys Asp Glu Phe Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 143

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 143

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 144

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 145

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 145

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 146

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 146

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 147

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 147

Gln Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 148

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 148

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 149

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 149

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Asn Ile Ile

1 5 10

<210> 150

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 150

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro

1 5

<210> 151

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 151

Leu Gln Tyr Asp Asn Leu

1 5

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 152

Arg Ala Ser His Ser Ile Ser Asn Phe Leu His

1 5 10

<210> 153

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 153

Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser

1 5

<210> 154

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 154

Gln Gln Ser Asn Ile Trp Ser Leu Thr

1 5

<210> 155

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 155

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Met Gln

1 5 10 15

<210> 156

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 156

Gly Ala Ser Asn Val Glu Ser

1 5

<210> 157

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 157

Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 158

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 158

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 159

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 159

Lys Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 160

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 160

Trp Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 161

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 161

Met Gln His Ile Glu Tyr Pro Phe Thr

1 5

<210> 162

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 162

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Tyr Asp Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 163

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 163

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Pro Thr

1 5

<210> 164

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 164

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr

1 5 10

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 165

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 166

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 166

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 167

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 167

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn

1 5 10 15

<210> 168

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 168

Leu Val Ser Arg Leu Asp Ser

1 5

<210> 169

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 169

Cys Gln Gly Thr His Phe

1 5

<210> 170

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 170

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 171

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 171

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 172

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 172

cttgtagaca gtgacggaaa cacctat

27

<210> 173

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer

<400> 173

ataggtgttt ccgtcactgt gtacaag

27

<210> 174

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 174

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 175

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 175

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asp Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 176

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 176

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 177

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 177

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 178

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 178

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn His Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 179

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 179

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Asn Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 180

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 180

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 181

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 181

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 182

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 182

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Ile Asn Thr Tyr Leu

1 5 10 15

His

<210> 183

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 183

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 184

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 184

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15
<210> 185
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutant antibody L chain
<400> 185
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Ser Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 186
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutant antibody L chain
<400> 186
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Trp Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 187
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutant antibody L chain
<400> 187
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Tyr Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 188
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> mutant antibody L chain
<400> 188
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15
<210> 189
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 189

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 190

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 190

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Pro Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 191

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 191

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Ala Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 192

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 192

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
Asn Asp Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 193

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 193

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
Asn Glu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 194

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 194

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Phe Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 195

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 195

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn His Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 196

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 196

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
Asn Asn Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 197

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 197

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
Asn Thr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 198

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 198

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gln Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 199

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 199

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asn Ile Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 200

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 200

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

<210> 201

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 201

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
           20           25           30
Asn Leu Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
           85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
           100          105          110

```

<210> 202

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 202

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

```

1       5       10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20      25      30
Asn Ser Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
      85      90      95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100     105     110

```

<210> 203

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 203

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1       5       10      15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20      25      30
Asn Trp Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35      40      45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50      55      60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65      70      75      80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
      85      90      95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100     105     110

```

<210> 204

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 204

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```



```

1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20           25           30
Asn Tyr Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
          85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 205

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 205

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1           5           10           15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20           25           30
Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
          35           40           45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
          85           90           95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 206

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 206

```

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

```

1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Val Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 207

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> mutant antibody L chain

<400> 207

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30
Asn Pro Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn
85 90 95
Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/013103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/18(2006.01), **C12N15/09**(2006.01), **A61K39/395**(2006.01),
A61P1/16(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **C07K14/47**(2006.01),
C12P21/08(2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K16/18(2006.01), **C12N15/09**(2006.01), **A61K39/395**(2006.01),
A61P1/16(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **C07K14/47**(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq,
SwissProt/PIR/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/022739 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 18 March, 2004 (18.03.04), & AU 2003261941 A1 & EP 1541680 A1	1-32
X	WO 2004/023145 A1 (Kabushiki Kaisha Peruseusu Proteomikusu), 18 March, 2004 (18.03.04), & AU 2002330482 A1	1-32
X	WO 204/038420 A1 (Kabushiki Kaisha Peruseusu Proteomikusu), 06 May, 2004 (06.05.04), & AU 2003261943 A1 & EP 1548442 A1	1-32

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 October, 2005 (11.10.05)

Date of mailing of the international search report
25 October, 2005 (25.10.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ **C07K16/18** (2006.01), **C12N15/09** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P1/16** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01), **C07K14/47** (2006.01), **C12P21/08** (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ **C07K16/18** (2006.01), **C12N15/09** (2006.01), **A61K39/395** (2006.01), **A61P1/16** (2006.01), **A61P35/00** (2006.01), **C07K14/47** (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI(DIALOG), CA(STN), REGISTRY(STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 2004/022739 A1 (中外製薬株式会社) 2004.03.18 & AU 2003261941 A1 & EP 1541680 A1	1-32
X	WO 2004/023145 A1 (株式会社ペルセウスプロテオミクス) 2004.03.18 & AU 2002330482 A1	1-32
X	WO 2004/038420 A1 (株式会社ペルセウスプロテオミクス) 2004.05.06 & AU 2003261943 A1 & EP 1548442 A1	1-32

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.10.2005

国際調査報告の発送日

25.10.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9281